

LES CHROMOSOMES PLUMEUX DE *XENOPUS LAEVIS* ET DE PLUSIEURS HYBRIDES DU GENRE *XENOPUS*

THÈSE

Présentée à la faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Werner P. MÜLLER

de

Zürich et Wiliberg (AG)

Thèse n° 1780

Genève
Imprimerie Pot
1976

LES CHROMOSOMES PLUMEUX
DE *XENOPUS LAEVIS*
ET DE PLUSIEURS HYBRIDES
DU GENRE *XENOPUS*

THÈSE

Présentée à la faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Werner P. MÜLLER

de

Zürich et Wiliberg (AG)

Thèse n° 1780

Genève
Imprimerie Pot
1976



La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs M. FISCHBERG, professeur ordinaire et directeur de thèse, H. TOBLER, professeur (Université de Fribourg) et J.B. GURDON, docteur ès sciences (Université de Cambridge), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENÈVE, le 8 novembre 1976.

Thèse n° 1780

Le Doyen:
Jean MULLER

REMERCIEMENTS

Je tiens ici à exprimer ma profonde gratitude au Professeur M. Fischberg, mon Directeur de thèse, pour la compétence dont il a fait preuve dans la marche de ce travail; je lui suis reconnaissant aussi de m'avoir introduit dans le domaine de la cytogénétique en m'offrant sa riche expérience personnelle.

Je remercie le docteur H.R. Kobel dont les conseils éclairés m'ont été d'une aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit et dans les questions relatives aux ovocytes polyploïdes.

Ma gratitude va également à Monsieur le docteur J.B. Gurdon du Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Université de Cambridge, Angleterre et à Monsieur H. Tobler, Professeur à l'Institut de Zoologie de l'Université de Fribourg, qui ont bien voulu faire partie du jury de thèse.

Messieurs Pierre Grütter et Alex Portianucha se sont chargés des travaux photographiques avec une conscience professionnelle. Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance à mes collègues pour l'aide apportée dans l'élaboration de ce travail.

TABLE DES MATIERES

	page
INTRODUCTION (Texte en français)	I
(texte en anglais)	IV
THE LAMPBRUSH CHROMOSOMES OF <u>XENOPUS LAEVIS</u>	283
Abstract	283
Introduction	283
Material and Methods	284
Results	285
Number of Chromosomes	285
Identification	285
Karyotype	288
Chromosomal Description	291
Chiasmata	293
References	295
OBSERVATIONS ON DIPLTENE CHROMOSOMES	
OF <u>XENOPUS</u> HYBRID OOCYTES	273
Abstract	273
Introduction	273
Material and Methods	274
Results	274
Discussion	279
References	281
DISCUSSION (Texte en français)	VII
RESUME (Texte en français)	XX
REFERENCES concernant Introduction et Discussion	XXIII



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545924_0017

INTRODUCTION

Les travaux présentés concernent deux champs de recherches mais la méthode de préparation des chromosomes et le stade de la prophase méiotique leur sont communs. D'une part, il s'agit des chromosomes plumeux de Xenopus laevis, et d'autre part du comportement des chromosomes dans les ovocytes des hybrides femelles du genre Xenopus. La méthode élaborée par Callan et Lloyd (1960) pour la mise en évidence des chromosomes plumeux de Triturus cristatus est la même pour Xenopus, le milieu de préparation étant toutefois modifié.

Xenopus laevis est un animal de laboratoire répandu qui sert aux recherches les plus diversifiées. La connaissance des chromosomes plumeux peut être utile aux recherches où une analyse cytogénétique détaillée est souhaitée. Dans ce but, une méthode de préparation de ces chromosomes a été élaborée. Les chromosomes plumeux (ou chromosomes en écouvillon) sont connus depuis que Flemming (1882) a démontré leur présence chez l'Axolotl. En général très longs (1700 μ de longueur maximale chez Salamandra; Mancino et al., 1969), ils portent sur un axe extrêmement mince des boucles attachées aux chromomères par paires unitaires ou multiples, ainsi que d'autres structures latérales. Ils apparaissent essentiellement pendant l'ovogenèse au stade diplotène de la prophase méiotique sous forme de bivalents. C'est chez les batraciens qu'ils ont été le plus

étudiés, mais ils ont également pu être démontrés chez des plantes (Grun, 1958; Lu et Raju, 1970), des invertébrés (Callan, 1957; Delobel, 1971; Hess, 1969; Kunz, 1969; Ribbert et Kunz, 1969) et parmi les vertébrés, chez des oiseaux (Koeke et Müller, 1965; Ahmad, 1970), des poissons, des reptiles et des mammifères, ainsi que dans les ovocytes primordiaux de l'homme (Baker et Franchi, 1967). Parmi les batraciens, beaucoup de recherches ont été faites chez les urodèles, dont les chromosomes plumeux se laissent facilement préparer et chez lesquels ils sont bien plus grands que ceux des anoures. Une seule carte de chromosomes plumeux a été dressée jusqu'à présent chez un anoure (Rana esculenta; Giorgi et Galleni, 1972). Chez d'autres anoures, ils ont néanmoins pu être mis en évidence (Srivastava et Bhatnagar, 1962, chez Rana cyanophlyctis; Macgregor et Kezer, 1970, chez Ascaphus) et ils ont pu être comparés aux chromosomes mitotiques chez Bufo par Ullerich (1970).

L'analyse des chromosomes du stade diplotène d'hybrides femelles est une première application de la technique mise au point pour la préparation des chromosomes plumeux. Dans les animaux d'espèces pures, les chromosomes homologues sont appariés et tenus ensemble par des chiasmata; ils forment des bivalents. Il est clair, comme beaucoup d'expériences le démontrent, que l'appariement et la formation de chiasmata sont soumis au contrôle génétique, qui, chez un animal hybride, est assumé par les deux génomes qui se trouvent dans un cyte.

La collaboration des deux génomes n'est possible que si "compréhension" il y a. Cette "compréhension" est une expression directe du contenu génétique des génomes maternel et paternel. Ayant croisé deux espèces très différentes, la divergence génétique est grande et la formation de bivalents est inhibée. Progressivement, avec la similitude du contenu génétique (qui est parallèle à la position systématique relative des espèces), davantage de bivalents se forment. Les hybrides peuvent donc servir à éclaircir les relations systématiques de leurs parents. Ceci a été le but premier de cette recherche, les relations des espèces de Xenopus étant un peu vagues. Fort heureusement, parmi les espèces de Xenopus, beaucoup de croisements (naturels ou artificiels) sont possibles et produisent des animaux hybrides viables qui sont maintenus dans notre laboratoire.

INTRODUCTION

This study concerns two different fields of research, but the same technique for the preparation of the chromosomes is used and the same stage of female meiotic prophase is analyzed. On the one hand, lampbrush chromosomes of Xenopus laevis laevis are described in some detail, and on the other hand, chromosome pairing in oocytes of hybrids of the genus Xenopus are analyzed. The method, elaborated by Callan and Lloyd (1960) for Triturus cristatus lampbrush chromosomes has been applied to Xenopus, the preparation medium only has been modified.

Xenopus laevis, a common laboratory animal, is used for studies of great diversity. The recognition of the lampbrush chromosomes could be of help, wherever a detailed cytogenetic analysis is desired.

The existence of lampbrush chromosomes was first noted by Flemming (1882) for the Axolotl. Generally very long (the maximum length in Salamandra being 1700 μ , Mancino et al., 1969), they bear on a thin axis, lateral loops and other lateral structures, in single or multiple pairs, attached to chromomeres. Lampbrush chromosomes appear mainly during oogenesis at the diplotene stage of meiotic prophase. They have been studied extensively in amphibia, but have equally been observed in plants (Grun, 1958; Lu et Raju, 1970), invertebrates (Callan, 1957; Delobel, 1971; Hess, 1969; Kunz, 1969; Ribbert and Kunz, 1969), birds (Koecke and Müller, 1965; Ahmad, 1970), fishes, reptiles,

mammals as well as in the primordial oocytes of man (Baker and Franchi, 1967).

Among amphibia, a great amount of work has been carried out with urodeles, as their lampbrush chromosomes can easily be prepared and are much longer than those of the Anura. Up to now, one working map only of lampbrush chromosomes of an anuran amphibian has been drawn (Rana esculenta; Giorgi et Galleni, 1972). Such chromosomes have, nevertheless, been observed in other Anura (Srivastava and Bhatnagar, 1962, in Rana cyanophlyctis; Macgregor and Kezer, 1970, in Ascaphus); in Bufo Ullerich (1970) was able to compare lampbrush with mitotic chromosomes.

The present analysis of Xenopus hybrid female lampbrush chromosomes is an application of the modified "Xenopus medium". In animals of pure species, the homologous chromosomes are paired and held together by chiasmata; they form bivalents. The pairing and the formation of chiasmata depends on genetic control, assumed in a hybrid animal by both genomes present in the cyte. The collaboration of the two different genomes is possible only if there is mutual "understanding". This "understanding" is a direct expression of the genetic content of the maternal and paternal genomes. If two very different species are crossed, the genetic divergence is large and the formation of bivalents

is hindered. By crossing species of a more similar genetic content (which is parallel to the relative systematic position of the species), more bivalents are formed. Hybrids can thus help to clarify the systematic relationship of their parents. This was the first object of this research, the relationship between the different species of Xenopus being rather vague. In Xenopus, many hybrid combinations can be realized either by natural or by artificial fertilization; they usually produce viable hybrid animals.

The Lampbrush Chromosomes of *Xenopus laevis* (Daudin)

W. P. Müller

Station de Zoologie Expérimentale, University of Geneva

Abstract. A method for the preparation of *Xenopus laevis* lampbrush chromosomes is given and a map of the eighteen chromosomes is presented. The main structures and their variability have been described. At the observed stage, chiasmata are distributed distally. The shorter the chromosome, the more distally are the chiasmata. Centromere positions could not be localized.

Introduction

Lampbrush chromosomes were first observed by Flemming (1882) in the Axolotl (*Siredon*) and described by Rückert (1892) in the selachian, *Pristiurus*. These are postsynaptic diplotene chromosomes appearing during oogenesis. Lateral loops and other objects of different morphological texture extend in pairs or multiples of pairs from the chromomeres. The features of lampbrush chromosomes are described in detail by Callan and Lloyd (1960). Their findings are generally accepted, except for the theory of loop function. Their proposed mechanism is contested by arguments of molecular biologists (Davidson *et al.*, 1966).

Besides in the oocytes of amphibians and selachians, lampbrush chromosomes have been demonstrated during gametogenesis of birds (Koecke and Müller, 1965; Ahmad, 1970), reptiles and mammals within the vertebrates and of some invertebrates (Callan, 1957; Delobel, 1971; Hess, 1969; Kunz, 1967; Ribbert and Kunz, 1969). In human primordial oocytes lampbrush-like structures have been shown by Baker and Franchi (1967). In plants, lampbrush chromosomes have been described by Grun (1958), Lu and Raju (1970). The apparition of lampbrush-like structures during shorter or longer periods of the cell cycle might be a general feature and the study of these structures is therefore of wide interest.

In *Anura*, lampbrush chromosomes are difficult to prepare as the nuclear sap is not liquid but jelly-like and for this reason only few investigations have been made. Although their existence has been known for a long time, thanks to histological sections from *Rana* (Schultze, 1887), useful "live" chromosome preparations have only recently been made (Giorgi and Galleni, 1972; Moresalchi and Filosa, 1965; Srivastava and Bhatnagar, 1962). Ullerich (1970) was able to demonstrate lampbrush

chromosomes in several *Anura*. In *Bufo* he established a correlation between lampbrush and mitotic chromosomes based on their respective length and centromere position. Macgregor and Kezer (1970) describe the lampbrush chromosomes of the tailed frog *Ascaphus*. Among the *Anura* the only lampbrush chromosome map drawn to date is that of *Rana esculenta* (Giorgi and Galleni, 1972). As *Xenopus* is a useful laboratory animal, an investigation of its lampbrush chromosomes is worthwhile in order to create a working basis for cytogenetic analysis at the oocyte level.

Materials and Methods

In order to obtain oocytes, mature *Xenopus* females are narcotized (0.1% MS 222, Sandoz) and opened ventro-laterally by a 1/2 cm incision parallel to the median line. Because of the lymph sacs, skin and muscles must be cut separately. A small part of the ovary is removed through this opening. The wound is afterwards closed with catgut (000 or 00) by sewing together muscles and skin. Such operations can be repeated every four weeks by alternating right and left side. There is no need to work under sterile conditions; the animals are not fed for one week following the operation and are kept under observation. There is no mortality.

The ovarian fragment thus removed is placed in a "solid watchglass" without saline. A square of glass is sealed with pure vaseline over the top of the container. Oocytes obtained from such ovarian fragments can give good preparations of lampbrush chromosomes for at least 8 hours after the operation when kept at about 7° C.

The best developed lampbrush chromosomes are obtained from oocytes with a diameter of 0.5 to 0.6 mm which is about half the size of a mature oocyte. This confirms the observations of Dumont (1972) on sections of ovaries. Chromosomes of smaller oocytes tend to stick together and to overlap and in more advanced oocytes loops are already contracted, leaving thus a short interval available for chromosomal analysis. This is in contrast to other species, in which lampbrush chromosomes are suitable for analysis during a much longer period of oocyte growth (Barsacchi, Bussoti and Mancino, 1970; Callan, 1966; Lacroix, 1968; Mancino and Barsacchi, 1965, 1966, 1969; Mancino, Barsacchi and Nardi, 1969).

Chromosomes are prepared according to the classical method of Callan and Lloyd (1960). In *Xenopus* oocytes, the nuclei are found easily, as the yolk separates well from the nuclear membrane. For the removal of the nuclear envelope it is recommended to use two forceps rather than a tungsten needle and forceps. Chromosomes spread out within about 20 minutes, but never adhere completely to the glass cover slide. This has enabled us to make permanent mounts of *Xenopus* lampbrush chromosomes.

A medium suitable for *Xenopus* lampbrush chromosomes has been found empirically:

KH_2PO_4	0.0060 M
Na_2HPO_4	0.0073 M
NaCl	0.0078 M
KCl	0.0388 M
Total	0.06 M

10 μl of neutralized formol (1 part 1/5 M phosphate buffer pH 6.9, 4 parts 37% formol) are added to 10 ml portions of this solution and then kept separately in "snap-cups" in order to guarantee a constant formol concentration. Formol vapour

as an agent in sap dissolution has already been recommended by Callan (1966). His procedure does not yield satisfactory results for *Xenopus* nuclear sap. Good preparations are obtained only when formol is added *directly* to the medium. Macgregor and Kezer (1970) made similar observations while preparing lampbrush chromosomes of the tailed frog *Ascaphus*. The pH value appears to be important. In the range of pH from 6.8 to 7.0 chromosomal preparation is possible, but above or below these limits, loops are of lower quality, which makes an accurate analysis of lampbrush structures difficult.

The chromosomes are observed with the help of an inverted phase-contrast microscope (Zeiss, Neofluar 100/1.30 Oel) and photographed on Kodak High contrast copy film under lower magnification (Zeiss, Neofluar 25/0.60, Ph 2). An Ukatron UN 60 flash attachment is introduced into the optical train.

Two series of preparations were analyzed; the series A, comprises twelve preparations from eleven different females, and series B contains ten preparations from one single female. Sixteen of the eighteen chromosomes could be identified definitely (Series A). Chromosomes XII and XIII resemble each other much and could not be distinguished. Series B served to establish the working map (Fig. 1).

Results

Number of Chromosomes

Wickbom (1945) was the first to establish the chromosome number of *Xenopus laevis* as $2n = 36$. In lampbrush chromosome preparations therefore, there are eighteen bivalents.

Identification

Lampbrush chromosomes may be identified by morphological characteristics such as spheres, telomeres, axial granules, loops and by their length. In accordance with their length the chromosomes are numbered from I to XVIII, the number I is given to the longest one.

Length. In *Salamandra*, lampbrush chromosomes attain a maximum length of $1700\ \mu$ (Mancino, Barsacchi and Nardi, 1969). Chromosomes in various species of *Triturus* have a length of up to $1000\ \mu$ (Barsacchi *et al.*, 1970; Callan and Lloyd, 1960; Gall, 1952; Mancino and Barsacchi, 1965, 1966). In *Pleurodeles*, the values lie between 160 and $500\ \mu$. In comparison to these measurements, *Xenopus* lampbrush chromosomes are short as shown in table 1 which gives the mean values of their lengths. As indicated by the corresponding standard errors, variation is such that there is considerable overlap between chromosomes. This implies that chromosomes cannot be identified by means of their length only.

Spheres. Among the different chromosomal structures, spheres are impressive. They are used for chromosome identification in *Salamandra* (Mancino *et al.*, 1969). However, they do not always possess landmark qualities as shown in *Echinaster* (Delobel, 1971). Under phase-contrast they appear either dark or refractile and reach a diameter of up to $5\ \mu$.

Spheres can be found at various locations and some free ones can stick to chromosomes. Spheres are incorporated into the working map only when they appear on the same site on both homologous bivalents. In chromosomes II, III and XVI spheres are used as landmarks.

A distinction can be made between different types of spheres. There are the "vacuolized spheres" of chromosome XVI. These are smaller than free nucleoli, refract light, and are fixed in great numbers around the axis, which often cannot be followed for more than a third of the chromosome length.

There are others, sphere-like globuli structures lying on chromosome XVIII. They measure between 1 and 2 μ and appear dark under the phase-contrast microscope. These globuli resemble the globuli found on *Echinaster* chromosomes described by Delobel (1971). Ten or more of them are like grapes, attached to the chromosome axis, and represent a reliable landmark for the immediate recognition of chromosome XVIII. In preparations A-1, B-7 and B-8 these globuli seem to be attached to the loop axes. However, in all other preparations these attachments cannot be seen. There are at least two loci responsible for sphere-like globuli formation. In preparation A-2 it can be observed that the region is separated by a double loop bridge and the globuli are distributed on both sides of the bridge.

Spheres on corresponding loci are similar but exceptions exist in which homologous spheres differ, i.e. chromosome XI (B-10) in which on one univalent there is one sphere while on the other two smaller spheres are found. A similar case of sphere differentiation is reported by Mancino and Barsacchi (1966). In *Xenopus* chromosome III, three developmental expressions of homologous spheres have been observed. First, in B-1, there is a large sphere on one of the univalents whereas a small sphere is found on the other. Secondly, in B-4, there are small granules found on the loci of sphere development, and thirdly, in B-7, each homologous univalent possesses two small spheres instead of the usual one. These last two examples are not expressed as "heterozygotic sphere development" but as "formational differences" manifested at loci which usually bear normal spheres.

Telomeres, Axial Granules and other Terminal Structures. Typical telomeres are a little larger than chromomeres, situated at the end of the chromosome axis and possess no loops. The ends of the chromosome axis can also bear sphere-like telomeres. They have the same size as the other spheres and always appear dark under the phase-contrast. Furthermore, there are granules of 1 to 2 μ in size found in various arrangements at the chromosome tips. It is probable that the terminal granules lie on small loop axes since Brownian movement reveals a weak attachment only to the chromosome axis. These can therefore not be axial granules.

Real axial granules on the other hand are of the same size, but, judging from the observed Brownian movement, they are attached directly to the axis. These rather rare axial granules are difficult to detect among the great number of other, free nuclear sap granules which stick at random to the chromosome axis. They are drawn on the working map only when found in the corresponding positions on both bivalents in at least 3 of the 10 preparations. However, they are of no value for chromosomal identification.

Loops. Loops are lateral structures of different lengths and varying morphology. They are attached pairwise to chromomeres in a constant manner along the chromosomes and therefore help in chromosomal identification. The longest ever observed loop measures 700 μ (*Salamandra*, Mancino, Barsacchi and Nardi, 1969). Very long loops are also reported by Callan and Lloyd (1960) with 200 μ for *Triturus viridescens* and 100 μ for *Triturus cristatus*.

A classification of *Pleurodeles* lampbrush chromosome loops is given by Lacroix (1968). Each author tends to use differing criteria in his loop characterization. Authors employ on one hand different expressions for the same structures such as "M" and "D" by Lacroix (1968) which correspond to "lumpy objects" and "currant buns" respectively by Callan and Lloyd (1960) and on the other hand the same expression for different structures such as "granular loop" (Delobel, 1971) and "granular loop" (Callan and Lloyd, 1960; Lacroix, 1968; Mancino, 1965, 1966). A uniform system for the classification of loop structures of different species is, therefore, impossible at the present time.

There are three distinct kinds of loops in *Xenopus*—normal, giant and granular loops. The normal ones include the majority and measure between 5 and 10 μ . These loops have already been observed by Callan (1963). Giant loops can reach a length of up to 60 μ . This length is even more surprising when compared with the mean total length of the two shortest chromosomes in the set which is less than 60 μ . The granular loops, bigger than the normal ones, have a matrix with little granules of about 2 μ . Examples of granular loops are found on chromosomes III and VI.

Loops of lampbrush chromosomes are thought to have a single DNA axis. Ullerich (1970), however, describes in *Anura* segments in which the loop axes seem to be composed of two double helices, brought to light by electron microscopy. The same phenomenon is shown by Fabergé (1970) to occur in the newt *Taricha*. There is a matrix of ribonucleoproteins surrounding the axis in an asymmetrical manner, resulting in the loops having a thick and a thin end. This asymmetry has been confirmed by Miller (1965) on electron microphotographs of the newt *Triturus viridescens*. Srivastava and Bhatnagar (1962), however, do not recognize such loop asymmetry in *Rana cyanophlyctis*, finding that all loops have

the same overall thickness. In *Xenopus*, loops without a particular matrix seem to have a uniform thickness. Distinct asymmetry, however, occurs on loops having a thick matrix as in chromosome I, and in chromosomes III and VI which possess granular loops. Generally speaking, loop asymmetry in *Xenopus* can not be excluded.

Double loop bridges. Lampbrush chromosomes, stretched either artificially or accidentally, break within the chromomeres forming double loop bridges. Wischnitzer (1957) observed single loop bridges in amphibian oocytes. His interpretation might, however, be due to artefacts. Longer chromosomes break more frequently than shorter ones due to mechanical stress (*Pleurodeles*, Lacroix, 1968; *Triturus cristatus*, Callan and Lloyd, 1960; *Triturus alpestris apuanus*, Mancino and Barsacchi, 1965; *Triturus vulgaris meridionalis*, Barsacchi, Bussotti and Mancino, 1970; *Rana cyanophlyctis*, Srivastava and Bhatnager, 1962). Double loop bridges appear frequently at the same loci, these may well be predetermined weak sites (*Pleurodeles*, Lacroix, 1968; *Triturus vulgaris meridionalis*, Barsacchi, Bussotti and Mancino, 1970). Such a localization of high frequency double loop bridges may be utilized as landmarks in chromosome identification. In *Xenopus*, besides spontaneous double loop bridges, there is a site on chromosome III, situated between the giant loops, which shows this phenomenon in five out of ten preparations. As chromosome III can easily be identified by other characteristics, the double loop bridge is in this case of little identification value.

Centromeres. Centromeres are mentioned in the literature citing lampbrush chromosomes either as axial granules not bearing loops (*Pleurodeles poireti*, Lacroix, 1968; *Triturus cristatus carnifex* and *Triturus cristatus cristatus*, Callan and Lloyd, 1960; *Triturus alpestris apuanus*, Mancino and Barsacchi, 1969; *Rana cyanophlyctis*, Srivastava and Bhatnager, 1962) or as distinct structures as found in *Triturus cristatus karelinii* (Callan and Lloyd, 1960), the Axolotl (Callan, 1966) or *Triturus viridescens* (Gall, 1952). In *Xenopus* it is not yet possible to relate any of the axial granules to centromeres. They are either much too variable, or there are numerous suspect granules on just one chromosome axis. Other methods (e.g. staining) should be used for centromere detection.

Karyotype

Fig. 1 shows the karyotype of the eighteen lampbrush chromosomes, drawn after analysis of ten preparations from one animal (Serie B). The chromosome axes are represented as a uniform line, corresponding to their mean lengths. Loops are drawn on one side of the axis only according to their respective mean length and texture. Little dots at the end of the axis symbolize telomeres, on the axis axial granules. Several little terminal dots denote the terminal granules. Their respective arrangements

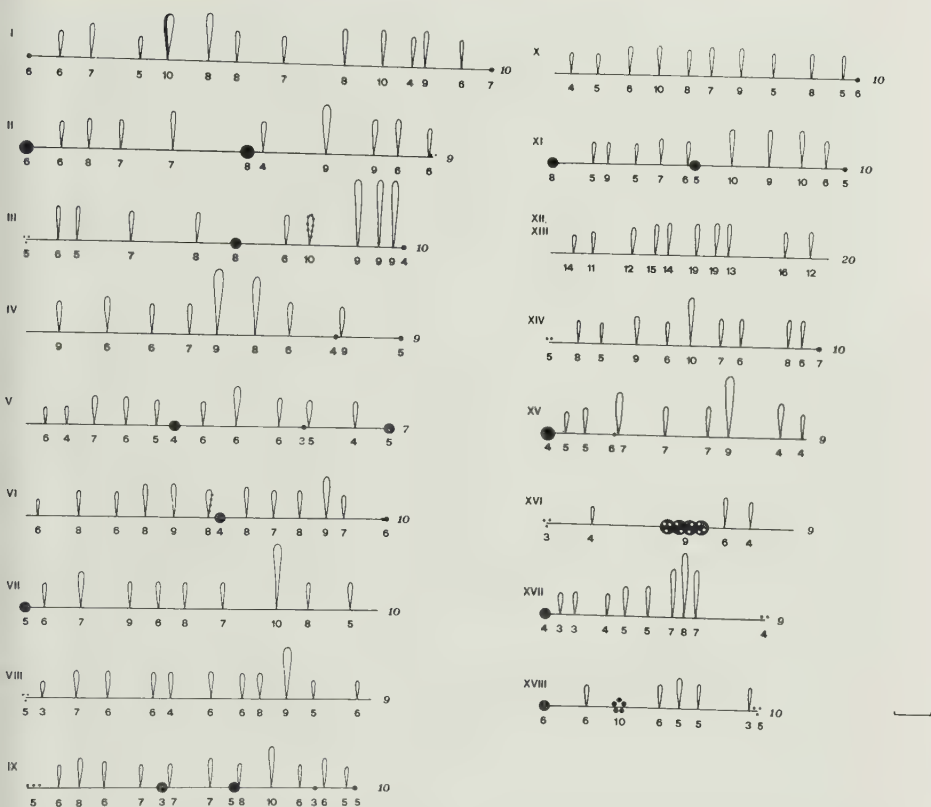


Fig. 1. Working map of *Xenopus laevis* lampbrush chromosomes. The significations of structures and numbers are explained in the text. The bar represents 10 μ .

signify: two dots = scattered, distal; three dots, arranged in a triangle = crowded, distal; three linear dots = crowded, which occupy more than the terminal position. Large dots at the end of the axis are sphere-like telomeres and on the axis they correspond to spheres. Big dots with little holes symbolize the vacuolized spheres of chromosome XVI. Medium dots, arranged in a circle, represent the sphere-like globuli structures of chromosome XVIII.

Different kinds of numbers are employed:

— *Roman numerals* indicate chromosome individuals, ranged after their mean length.

— *Cursive arabic numerals* indicate the number of analysable chromosomes, which contributed to the karyotype.

— *Arabic numerals* indicate the number of times a specific structure has been observed on the particular chromosome. These indications are

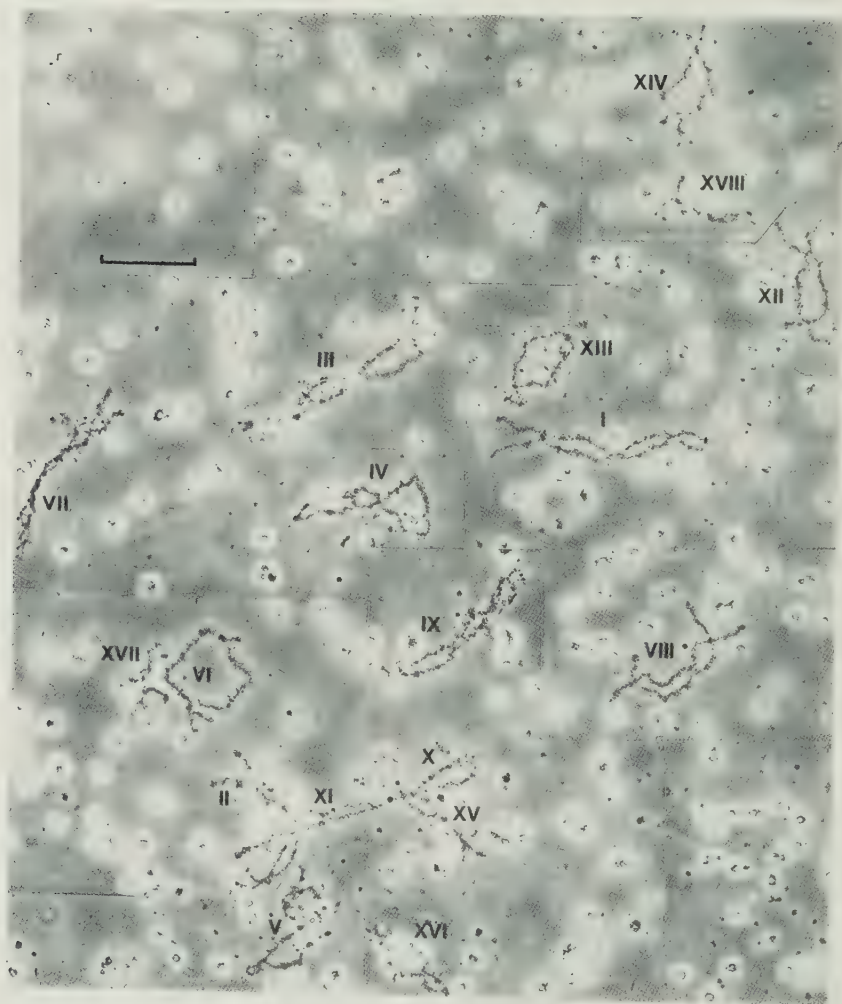


Fig. 2. Photograph of a "live" preparation of *Xenopus laevis* lampbrush chromosomes. The bar represents 50 μ

an attempt to demonstrate lampbrush structure variability which must either be due to variable gene expression in the different oocytes or to the instability of the delicate structures during preparations. These numbers are too small to be statistically analyzed.

The orientation of the chromosomes is arbitrary as the centromere positions are not known.

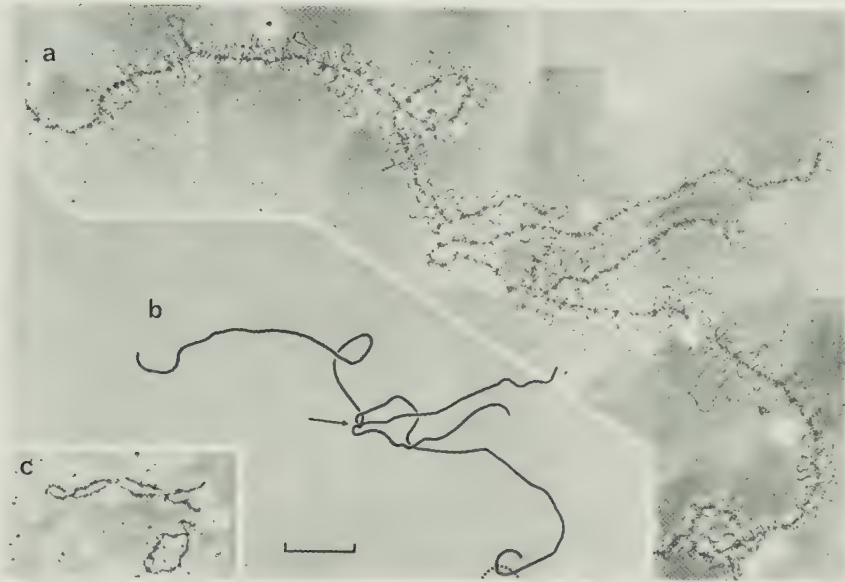


Fig. 3a-c. Comparison between lampbrush chromosomes of *Triturus cristatus* and *Xenopus laevis*. (a) Bivalent I of *Triturus cristatus*. (b) Schematic drawing of the same chromosome. The arrow indicates the position of the chiasma. (c) Bivalents I and XIII of *Xenopus laevis*. The bar represents 50 μ and is valid for a and c

Chromosomal Description

The main characteristics of the chromosomes are given in Table 1 and their positions, expressed in percent of individual chromosome length. Chromosomes I, III, XVI, XVII, and XVIII are the easiest to identify and attention should first be directed towards these when analyzing the chromosome set.

Chromosome II shows frequent double loop bridges in the sphere region. Chromosome III is very easily recognizable by its granular loop, the sphere and the distal giant loops, which are often separated by double loop bridges from the rest of the chromosome. Chromosome IV is well recognizable when the giant loops are spread out and do not adhere to the chromosome axis. Otherwise it might be mistaken for chromosome V. In four preparations chromosome VI possesses several spheres instead of only one. Chromosomes VII, VIII and IX are of approximately the same length and have giant loops in similar positions. Other loops (see Fig. 1) must be considered to determine these three chromosomes. Chromosome X is without special characteristics and best identified by the three loops in positions 35, 44, 62. A central group of big normal loops permits

classification of, but not distinction between, chromosomes XII and XIII. Chromosome XIV is among the short chromosomes the only one with a single central giant loop. The position of the giant loop at position 71 makes identification of chromosome XV easy. Chromosome XVI is very easily recognizable when free of nucleoli. The characteristic group of three giant loops makes recognition of chromosome XVII easy. The sphere-like globuli structures are exclusively found on chromosome XVIII.

Fig. 2 represents a photograph of the eighteen *Xenopus* lampbrush bivalents (Preparation B-2) in which the main features of chromosomes I, III, XVI, XVII and XVIII are visible. Note the numerous nucleoli and the granules free in the nuclear sap.

Analysis of *Xenopus* lampbrush chromosomes is not facilitated by their small size. A comparison of the longest lampbrush chromosomes from *Triturus cristatus* and *Xenopus laevis* gives a clear idea of the size differences (Fig. 3).

Chiasmata

The frequency of chiasmata per lampbrush bivalent is in most species slightly higher than 2.0. *Salamandra* with 3.06 (Mancino, Barsacchi and Nardi, 1969) and *Rana esculenta* with 3.51 (Giorgi and Galleni, 1972) have exceptionally high chiasma frequencies.

In *Xenopus*, the chiasma frequency of 1.86 is low. This frequency might be correlated to the absolute chromosome length which is long in *Salamandra* and short in *Xenopus*.

Chiasma frequency per bivalent can directly be correlated to the chromosome length within the same species (Srivastava and Bhatnagar, 1962). With the help of a rank correlation coefficient, due to Spearman (1967), it can be shown that a positive correlation does exist in *Salamandra salamandra*, *Triturus alpestris alpestris*, *Triturus vulgaris meridionalis* and *Rana esculenta* and that there is no such correlation in *Triturus helveticus helveticus*, *Triturus italicus* and *Triturus marmoratus* (in the last species chromosome I has not been considered, as it is partially heteromorphic and has a particularly low chiasma frequency) and *Xenopus laevis laevis*.

Chiasmata can have preferential sites on the chromosome axis or can be distributed at random. In *Triturus cristatus*, *Triturus alpestris alpestris*, *Triturus italicus*, *Triturus vulgaris meridionalis* and *Rana esculenta* the chiasmata are procentrically localized. This preferential chiasma position can even lead to the detection of centromeres (Callan and Lloyd, 1960). In the Axolotl (Callan, 1966), where chiasmata are by superficial observation randomly distributed over the chromosome axis, it could nevertheless be shown, that there exist preferred sites. No localization data are reported for *Salamandra salamandra*.

In *Xenopus*, chiasmata seem to be localized rather distally. To test this hypothesis, the chromosome axes are divided into four equal parts. The chiasmata from the two distal parts are added as well as those from the two middle parts. In 14 of the 18 chromosomes there are more chiasmata in the distal parts. In two chromosomes there is no difference and in two chromosomes there are more chiasmata in the middle portion. The two chromosomes with equal distribution were not included in the test of χ^2 , which reveals a statistically assured distal distribution of the chiasmata ($\chi^2_{\text{IDF}} = 7.56$, $p < 0.05$).

When counting the number of medial and distal chiasmata, another relation seems evident: the shorter a chromosome is, the more often the chiasmata are distributed distally. A quotient $\frac{\sum \text{chi. dist.}}{\sum \text{chi. med.}}$ is formed, resulting in the ranking of the chromosomes. The length rank number and the quotient rank number correspond well as can be shown by means of the rank correlation coefficient ($r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)} = 0.58$, $r_s(0.05) = 0.468$) by Spearman (see Snedecor and Cochran, 1967, P. 193).

Xenopus lampbrush chromosomes revealed no further information about the nature of chiasmata. A double chromosome axis or split chromomere where a chiasma is formed was never seen. It was observed, however, that a chromomere is always situated at the connection of the two univalent axes.

Chiasma localization in the distal parts and the relation of length and frequency of such distal chiasmata can be explained by mechanical stiffness of the chromosome. Chiasmata would then no longer be at the same sites as the crossing overs and a certain terminalisation would have occurred. In older oocytes there should thus be found less chiasmata than in younger ones (Srivastava and Bhatnagar, 1962). In this analysis of lampbrush chromosomes in which the diameter of the oocytes was kept more or less constant no such correlation could be found.

On the other hand, a first established chiasma might interfere with the formation of further chiasmata in its proximity and thus account for the described localization. If, in addition, the initial chiasmata are preferentially formed at the distal parts of the chromosome, the chiasma distribution in *Xenopus* is comprehensive and conform to the findings of Henderson (1963) in *Schistocerca gregaria*.

Acknowledgements. The author wishes to thank Professor M. Fischberg for his interest and support of this work and Dr. H.R. Kobel for stimulating discussions. P. Grütter executed the photographic part of this work. This investigation has been supported by a grant (No. 3.60.68) from the Fonds national suisse de la recherche scientifique.

References

- Ahmad, M.S.: Development, structure and composition of lampbrush chromosomes in domestic fowl. *Canad. J. Genet. Cytol.* **12**, 728–737 (1970)
- Baker, T.G., Franchi, L.L.: The structure of the chromosomes in human primordial oocytes. *Chromosoma (Berl.)* **22**, 358–377 (1967)
- Barsacchi, G., Bussotti, L., Mancino, G.: The maps of the lampbrush chromosomes of *Triturus (Amphibia Urodela)*. IV. *Triturus vulgaris meridionalis*. *Chromosoma (Berl.)* **31**, 255–279 (1970)
- Callan, H.G.: The lampbrush chromosomes of *Sepia officinalis* L., *Anilocera physodes* L. and *Scyllium catulus* Cuv. and their structural relationship to the lampbrush chromosomes of *Amphibia*. *Pubbl. Staz. Napoli* **29**, 329–346 (1957)
- Callan, H.G.: The nature of lampbrush chromosomes. *Int. Rev. Cytol.* **15**, 1–34 (1963)
- Callan, H.G.: Chromosomes and nucleoli of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Cell Sci.* **1**, 85–108 (1966)
- Callan, H.G., Lloyd, L.: Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (Laurenti). *Phil. Trans. B* **243**, 135–219 (1960)
- Davidson, E.H., Crippa, M., Kramer, F.R., Mirsky, A.E.: Genomic function during the lampbrush chromosome stage of amphibian oogenesis. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **56**, 856–863 (1966)
- Delobel, N.: Etude descriptive des chromosomes en écouvillon chez *Echinaster sepositus* (Echinoderme, Astéride). *Ann. Embr. Morph.* **4**, 383–396 (1971)
- Dumont, J.N.: Oogenesis in *Xenopus laevis*. I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* **136**, 153–179 (1972)
- Fabergé, A.C.: A doublet structure in the loops of lampbrush chromosomes of the newt, *Taricha granulosa*. *Caryologia (Firenze)* **23**, 241–250 (1970)
- Flemming, W.: *Zellsubstanz, Kern, und Zelltheilung*. Leipzig: F.C.W. Vogel 1882
- Gall, J.G.: The lampbrush chromosomes of *Triturus viridescens*. *Exp. Cell Res., Suppl.* **2**, 95–102 (1952)
- Giorgi, F., Galleni, L.: The lampbrush chromosomes of *Rana esculenta* L. (*Amphibia-Anura*). *Caryologia (Firenze)* **25**, 107–123 (1972)
- Grun, P.: Plant lampbrush chromosomes. *Exp. Cell Res.* **14**, 619–621 (1958)
- Henderson, S.A.: Chiasma distribution at diplotene in a locust. *Heredity* **18**, 173–190 (1963)
- Hess, O.: Veränderungen der Chromosomenstruktur und ihre Beziehungen zur genetischen Funktion. *Rev. suisse Zool.* **76**, 603–641 (1969)
- Koecke, H.U., Müller, M.: Formwechsel und Anzahl der Chromosomen bei Huhn und Ente. *Naturwissenschaften* **52**, 483 (1965)
- Kunz, W.: Lampenbürstenchromosomen und multiple Nukleolen bei Orthopteren. *Chromosoma (Berl.)* **21**, 446–462 (1967)
- Lacroix, J.C.: Etude descriptive des chromosomes en écouvillon dans le genre *Pleurodeles* (*Amphibien, Urodèle*). *Ann. Embr. Morph.* **1**, 179–202 (1968)
- Lu, B.C., Raju, N.D.: Meiosis in *Coprinus*. II. Chromosome pairing and the lampbrush diplotene stage of meiotic prophase. *Chromosoma (Berl.)* **29**, 305–316 (1970)
- Macgregor, H.C., Kezer, J.: Gene amplification in oocytes with 8 germinal vesicles from the tailed frog *Ascaphus truei* Stejneger. *Chromosoma (Berl.)* **29**, 189–206 (1970)
- Mancino, G., Barsacchi, G.: Le mappe dei cromosomi “lampbrush” di *Triturus (Anfibi Urodela)* I. *Triturus alpestris apuanus*. *Caryologia (Firenze)* **18**, 673–665 (1965)
- Mancino, G., Barsacchi, G.: Le mappe dei cromosomi “lampbrush” di *Triturus (Anfibi Urodela)* II. *Triturus helveticus helveticus*. *Riv. Biol.* **59**, 311–351 (1966)

- Mancino, G., Barsacchi, G.: The maps of the lampbrush chromosomes of *Triturus* (Amphibia Urodela) III. *Triturus italicus*. *Ann. Embr. Morph.* **2**, 355–377 (1969)
- Mancino, G., Barsacchi, G., Nardi, I.: The lampbrush chromosomes of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia Urodela). *Chromosoma* (Berl.) **26**, 365–387 (1969)
- Mancino, G., Nardi, I.: Chromosomal heteromorphism and female heterogamety in the marbled newt *Triturus marmoratus* (Latreille, 1800). *Experientia* (Basel) **27**, 821–822 (1971)
- Miller, O.L.: Fine structure of lampbrush chromosomes. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* **18**, 79–99 (1965)
- Moresalchi, A., Filosa, S.: Osservazioni sui cromosomi piumosi di *Rana esculenta* L. *Atti Soc. Peloritana* **11**, 211–219 (1965)
- Ribbert, D., Kunz, W.: Lampenbürstenchromosomen in den Oocytenkernen von *Sepia officinalis*. *Chromosoma* (Berl.) **28**, 93–106 (1969)
- Rückert, J.: Zur Entwicklungsgeschichte des Ovarialeies bei Selachiern. *Anat. Anz.* **7**, 107–158 (1882)
- Schultze, O.: Untersuchungen über die Reifung und Befruchtung des Amphibien-eies. *Z. wiss. Zool.* **45**, 177–226 (1887)
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G.: *Statistical methods*. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press 1967
- Srivastava, M.D.L., Bhatnagar, A.N.: Lampbrush chromosomes of *Rana cyanophlyctis*. *Cytologia* (Tokyo) **27**, 60–71 (1962)
- Ullerich, F.-H.: DNS-Gehalt und Chromosomenstruktur bei Amphibien. *Chromosoma* (Berl.) **30**, 1–37 (1970)
- Wickbom, T.: Cytological studies on Dipnoi, Urodela, Anura and Emys. *Hereditas* (Lund) **31**, 241–346 (1945)
- Wischnitzer, S.: A study of the lateral loop chromosomes of amphibian oocytes by phase contrast microscopy. *Amer. J. Anat.* **101**, 135–167 (1957)

Received May 29, 1974 / Accepted by W. Beermann
Ready for press June 3, 1974

W.P. Müller
Station de Zoologie Expérimentale
154, Route de Malagnou
CH-1224 Chêne-Bougeries/Genève
Switzerland

Diplotene Chromosomes of *Xenopus* Hybrid Oocytes

W.P. Müller

Station de Zoologie Expérimentale, 154, Route de Malagnou, CH-1224 Chêne-Bougeries, Genève, Switzerland

Abstract. Observations on meiotic diplotene chromosomes from oocytes of *Xenopus* species and subspecies hybrids are reported. Species interrelationships are established on the basis of the number of bivalents in the respective hybrids. Polyploid oocytes were found and their origin by supplementary endoreduplication placed at the differentiation stage of gametogenesis when oogonia become oocytes. The significance of polyploid oocytes for speciation is discussed.

Introduction

The cytological aspects of animal hybrids have been reviewed extensively by White (1973). Within amphibia, hybrids are either artificially produced as in *Taricha* (Twitty, 1964), *Triturus* (Lantz and Callan, 1954 and Spurway, 1953), *Pleurodeles* (Gallien, 1969), *Bufo* (Blair, 1972 and Delarue, 1974), *Rana* (Kawamura et al., 1972; Elinson, 1975), *Xenopus* subspecies (Blackler et al., 1965 and Blackler and Fischberg, 1968) and *Xenopus* species (Blackler and Gecking, 1972) or exist naturally as is the case for *Triturus blasii* (Vallée, 1959), *Rana esculenta* (Berger, cited in Blankenhorn et al., 1971), furthermore Knoepffler (1967) claimed to have found natural hybrids of *Xenopus fraseri* × *X. tropicalis*.

Our knowledge of the interrelationship between *Xenopus* species is still vague. Blair (1972) states that "hybridization experiments provide a powerful tool for evaluating the degree of affinity between species". Different criteria may help in positioning these affinities, as for example the chiasma frequency (Spurway, 1953), morphological characteristics (Blair, 1972; Twitty, 1964), physiological, behavioural or genetic values. Bytinski-Salz (1934) has already used the number of bivalents in sphingid moth hybrids to shed light on their interrelationships and White (1973) states that "the extent to which the chromosomes of the F_1 hybrids pair at meiosis seems to be directly correlated with the degree of relationship between the parent species, as judged by ordinary taxonomic criteria". Besides defining relationships between *Xenopus* species, the

results may also give further information on meiotic prophase behaviour in species hybrids.

It is fortunate that numerous hybrid combinations are available in the genus *Xenopus* and that the diplotene chromosomes in the females are quite long (ten times as long as mitotic chromosomes).

Material and Methods

Hybrids of the following *Xenopus* species and subspecies have been used for this investigation: B = *X. borealis*, C = *X. clivii*, F = *X. fraseri*, G = *X. gilli*, L = *X. laevis laevis*, M = *X. mülleri*, P = *X. laevis petersi* and V = *X. laevis victorianus*.

Drs. M. Fischberg, H. Kobel and C. Loumont produced, in a series of experiments during the last ten years, many of the possible cross combinations either by natural or artificial fertilization. Some of the hybrids date from earlier experiments (Blackler et al., 1965; Blackler and Fischberg, 1968). The following F₁ hybrids are stocked in our laboratory and have been available for the present study: (the ♀ parent stand left) BC (means F₁ from ♀ B × ♂ C), BF*, BL, BM, BP, CB, CM, FL, FM, FP, LB, LC, LF, LG, LM, LP, MB, MC, MG*, ML*, MP*, MV, PF, PG, PL, PM, PV, VB, VF, VG, VL, VM and VP. Hybrids marked by * are sterile and their ovaries contain no oocytes. The other combinations possess ovaries with oocytes. Oocytes of about half the size (0.5–0.6 mm) of fully grown oocytes were examined as they contain diplotene stage chromosomes which are in the most developed lampbrush configuration. According to the classification of Dumont (1972), these oocytes are in stage III or early stage IV.

The method for preparation is the one proposed by Callan and Lloyd (1960) for *Triturus cristatus* lampbrush chromosomes, modified for the use of *Xenopus laevis laevis* lampbrush chromosomes (Müller, 1974). The medium was left unchanged for all hybrid combinations, although not optimal for all of them.

Results

Chromosomes in oocytes form either bivalents (Figs. 1, 2b, c) or remain unpaired as univalents (Figs. 1 and 2a). The closer the two crossed species are systematically, the higher the expected number of bivalents. Oocytes from subspecies hybrids always form the maximum number of 18 bivalents. Meiotic differences can, however, be detected between crosses using the L, P or V subspecies as parents by taking into account the number of chiasmata per bivalent (Table 1). The frequencies are all situated at about 2.5 chiasmata/bivalent and no statistically calculable difference between the hybrid combinations is revealed. PV and VP have a few more chiasmata, while LP and PL have a few less. When the results of these latter two reciprocal crosses are compared, a statistically significant difference is obtained ($p < 0.001$, test in Snedecor and Cochran, p. 104). The meiotic behaviour in these subspecies hybrids agrees with the observations of Blackler et al., (1965) and Blackler and Fischberg (1968) that F₁ offspring of subspecies crosses are fully fertile. Parker (1956), however, recognized five subspecies in the *X. laevis* Rassenkreis; namely in addition to the three already mentioned ones *X. laevis borealis* and *X. laevis bunyoniensis*. However, hybrids of any *laevis* subspecies with B [= *X. (l.) borealis*] never form bivalents (Table 2) and B must, therefore, be considered as a species on its own right. Tymowska and Fischberg (1973), in an investigation of mitotic chromosomes, already sepa-

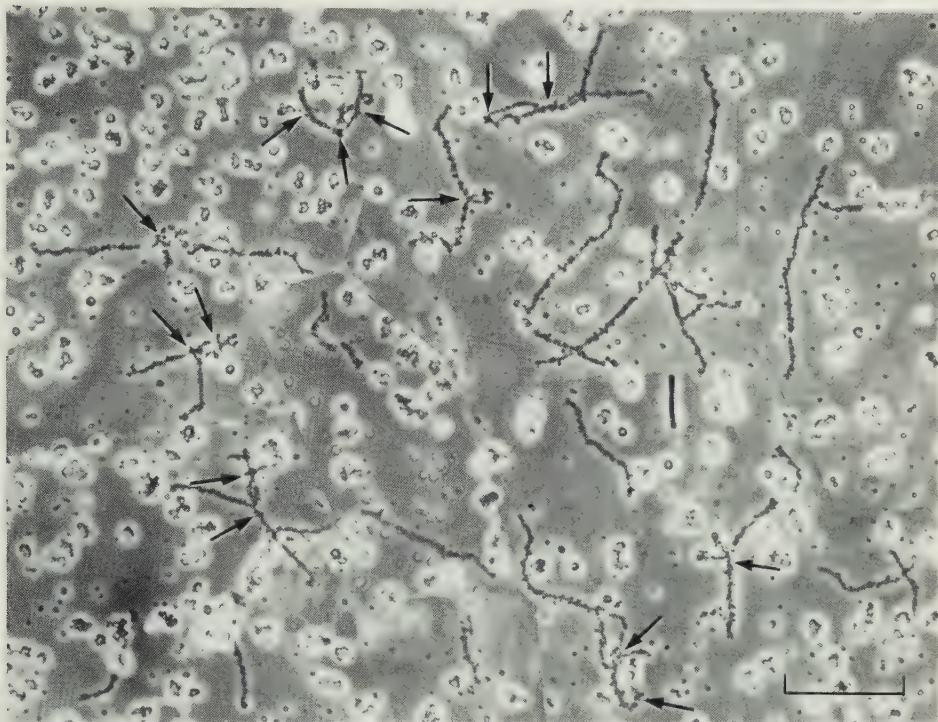


Fig. 1. A composed picture of the lampbrush chromosomes from one oocyte of a *Xenopus* species hybrid (PG). There are 8 bivalents, held together by 14 chiasmata (arrows) and 19 univalents. Bar = 50 μ m

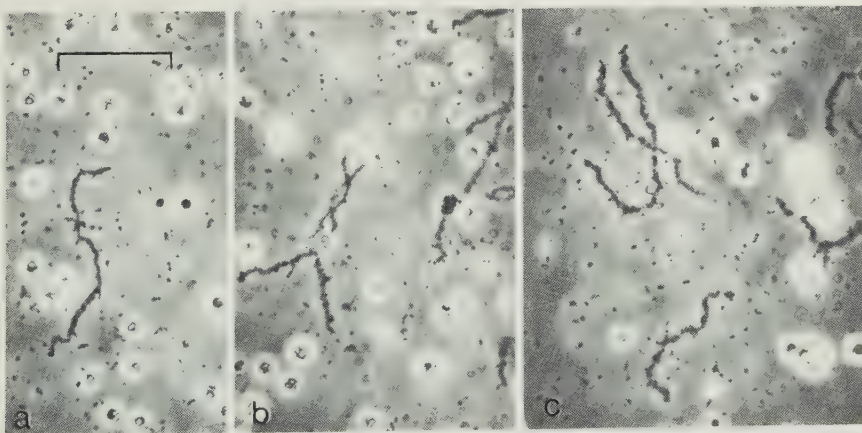


Fig. 2a-c. **a** Univalent (BL). **b** Bivalent, formed by homologous chromosomes (BL). **c** Bivalent, formed by heterologous chromosomes (VM). Bar = 50 μ m

Table 1. Chiasma frequencies per bivalent of the various combinations of *Xenopus laevis* subspecies

$\frac{\delta}{\phi}$	L	P	V
L	2.52	2.18	no hybrids available
P	2.14	2.52	2.72
V	2.58	2.85	2.62

Table 2. Numbers of bivalents and chiasmata per oocyte in the different F_1 species hybrid combinations

Hybrid	Analysed number of		Number of bivalents/oocyte		Mean number of chiasmata/oocyte
	animals	oocytes	range	mean	
BC	4	35	0-4	1.7	1.8
BL	2	17	0-4	1.2	1.8
BM ^b	3	10	0-6	3.0	5.0
BP	2	13	0-4	1.2	1.2
CB	3	26	0-3	1.2	1.2
CM ^{a, b}	3	21	1-3	1.5	1.5
FL	2	4	1-2	1.5	2.0
FM	2	14	0-1	0.07	0.07
FP ^a	3	7	0-2	0.7	1.1
LB	4	10	0-1	0.5	0.5
LC	3	24	0-3	1.3	1.4
LF	3	11	0-3	0.7	1.9
LG ^b	2	4	5-7	6.3	10.8
LM ^b	2	8	0-5	2.5	3.2
MB ^b	2	9	3-7	5.0	6.7
MC	4	35	0-3	1.5	1.5
MV ^a	1	4	0-2	0.8	1.0
PF	2	10	1-5	2.9	4.0
PG	3	22	7-18	13.4	22.8
PM	2	12	0 2	1.0	1.5
VB ^{a, b}	4	10	0 2	1.0	1.0
VF ^a	2	6	0-2	1.0	1.7
VG ^b	2	11	4-18	10.2	16.1
VM	3	12	0-4	1.6	1.7

^a 3n animals occur.^b 4n oocytes occur

rated B from the *X.laevis* Rassenkreis. Fischberg (unpubl.) obtained sterile F_1 ♂ of the cross B × L. No hybrid was produced with *X.l.bunyiensis* as a parent species.

Oocyte lampbrush chromosomes of species hybrids often form clusters or nets (Fig. 3). This is probably due to "stickiness", which occurs frequently when univalents are involved in meiosis (Malik and Grover, 1973; Sjödin, 1970). Preparations of sticky chromosomes do not allow further analysis. When chromosomes are spread out freely, univalents can be observed besides bivalents (Fig. 1).

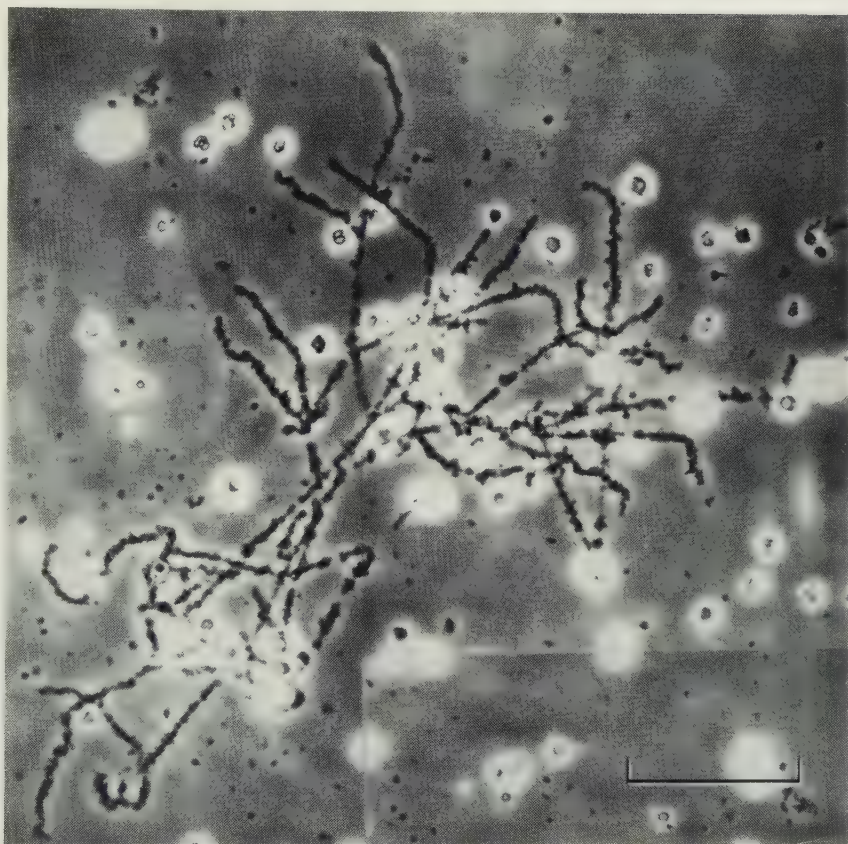


Fig. 3. Preparation with typical "net" of chromosomes (BM). Bar = 50 μ m

Bivalents can be formed by chromosomes of equal (Figs. 1 and 2b) or unequal (Fig. 2c) lengths. Unequal bivalents imply that the chromosomes are heterologous, whereas equal bivalents could, or could not, represent homologous chromosomes. The majority of bivalents are of equal length and only a few, conspicuously unequal pairs of chromosomes are seen. The actual homology of the two partners of a hybrid bivalent can, of course, not be affirmed as their intrinsic chromosomal structure is unknown. The very low number of chiasmata in bivalents of species hybrids (Table 2) might indicate, that these bivalents are formed by chromosomes which are only partially homologous. For these reasons no distinction is made between equal and unequal bivalents in counting their number.

Table 2 summarizes the results of the observations. The number of examined animals and preparations is relatively small due to preparation difficulties; the results, however, are sufficiently clear to allow conclusions to be drawn concerning the interrelationships between the different species. The number of bivalents per oocyte varies between zero and two in most of the hybrid combinations; LG, VG, PG, BM and MB have three or more bivalents. PG

and VG have approximatively the same number of bivalents while LG has relatively fewer. BM and MB, with three and five bivalents respectively per oocyte, stand apart from any other hybrid combination. With the exception of L, V and P, every analysed group of *Xenopus* represents, as judged by the present results, species on their own right.

Reciprocal hybrids of the combinations VM/MV, LF/FL, PF/FP, LB/BL, BM/MB, CB/BC and CM/MC were available. For the sake of reference, Table 2 has been arranged in alphabetical order, reciprocal hybrids do, therefore, not appear consecutively. No significant difference of the number of bivalents between two reciprocal combinations was observed. There is, therefore, no maternal effect involved and the chromosomes in the oocytes might freely express their genes affecting chromosomal pairing. The chiasma-frequency is mentioned in order to give complete information to the reader wishing to compare these data with those of other publications in which chiasma-frequency is the chosen parameter of comparison.

A diagram (Fig. 4) of the relative position of the species based on the values presented in Table 2, and expressed by the thickness of the connecting lines which are directly proportional to the number of bivalents formed, gives a tentative evaluation of their interrelationship. The close relationship of G with L, V and P or that of B with M is evident. F and C stand further off from the rest of the *Xenopus* species.

During this investigation, a considerable number of polyploid oocytes was observed. There are, on one hand, triploid animals with exclusively triploid oocytes. The hybrid combinations, in which triploid animals have been observed, are marked by ^a in Table 2. Their origin is probably due to hybridization as explained by Fischberg and Beatty (1952) for mice. Triploid oocytes contain bivalents and univalents in equal number (18 of each) and trivalents were never seen. On the other hand, ovaries of diploid hybrids may contain a mixed population of 2n and 4n oocytes. Combinations, in which animals with 2n and 4n oocytes have been observed, are marked by ^b in Table 2. In diploid oocytes a restricted number of bivalents is observed, depending on the hybrid combination (Table 2). Tetraploid oocytes, however, show uniformly 36 bivalents. It is obvious that the doubling of the chromosome number, which leads to a tetraploid oocyte, must be due to either a supplementary duplication, possibly an endoreduplication, or to the suppression of an oogonial cell division after the S-phase. For reasons of simplicity we do not distinguish between these two possibilities. Pairing of chromosomes is apparently restricted to identical sister chromosomes and meiotic segregation gives rise to diploid mature eggs that contain one complete chromosome set of each of the two parental species. Such eggs have therefore a genotype identical to that of the hybrid mother (Kobel and Du Pasquier, 1975).

The question of when this supplementary duplication occurs can be approached in the following manner. If the reduplication occurs after zygotene, then at least some multivalents would be expected in tetraploid oocytes of LG hybrids which show a fair number of bivalents in the corresponding diploid oocytes. Since all preparations of tetraploid oocytes showed exclusively bivalents, the reduplication must have occurred before zygotene. The same evidence is

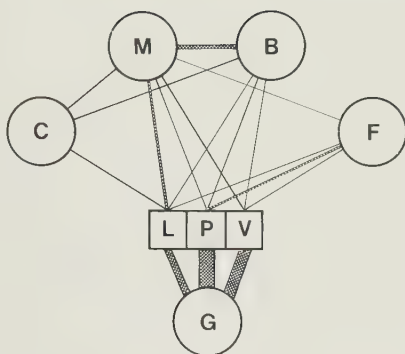


Fig. 4. Diagram of the *Xenopus* species interrelationships. The thickness of the connecting lines is proportional to the degree of the affinity between the respective species

obtained from triploid back-crossed animals ♀ LG × ♂ L (LGL) in some of which the ovaries are composed of a mixed population of 3n and 6n oocytes. Triploid oocytes contain 18 bivalents and 18 univalents. But 6n oocytes again contain bivalents exclusively which indicates that chromosomes could not have been paired before reduplication occurred. These 6n oocytes clearly demonstrate that the "order" for an additional reduplication concerns all chromosomes and not just those which have no prospective pairing partner. If it were not so, 4n oocytes LLGG (the G genome only doubled by endoreduplication) would result. Such oocytes have so far not been found. A third criterion for endoreduplication occurring before zygotene is furnished by the size of the oocytes. The volume of fully grown and spawned 4n oocytes is roughly twice (1.9 times) the volume of 2n oocytes. Two distinct size classes of oocytes exist and no intermediates have been found (Kobel, unpubl.). An oocyte's volume and its ploidy are directly correlated parameters. The logical conclusion to be drawn from the double volume is that during the whole growing period, starting from the time the oocyte was the size of an oogonium, large oocytes must have been tetraploid.

Cuellar (1974) does not exclude the possibility of endoreduplication as a pure mitotic (gonial) event. Considering that 4n oocytes have a volume twice that of 2n oocytes, a rapid check on an ovary permits one to see if any spontaneous polyploidization has occurred. Mitotic oogonial endoreduplication might, however, have occurred during the multiplying phase of the oogonia. Each oogonium, once having a fixed place in the ovary, forms a clone of identical cells. Therefore, a mosaic pattern of large oocyte clones amongst smaller diploid oocytes would be the expected ovarian morphology. This, however, is not observed since large oocytes are randomly distributed. It is, therefore, proposed that the period of transition from oogonia to oocytes is the moment of supplementary reduplication.

Discussion

In sterile species hybrids, only a minor fraction of the chromosomes pair (Lantz and Callan, 1954; Chandley et al., 1974). Table 2 shows that the number of

bivalents in *Xenopus* species hybrids is also very low. This asynapsis in hybrids can either be explained by structural differences of the chromosomes or by genes affecting synapsis (see also Riley and Law, 1965). This cooperative effect between the two modes of control might be suggested by observations on some of the *Xenopus* hybrids. In the subspecies hybrids of L, V and P, chromosomes always pair suggesting a rather similar internal organization of these chromosomes. The hybrid of each of the subspecies with G, however, reveal considerable differences; LG having less bivalents than PG or VG. These differences might partially be due to influences of gene products.

The formation of chiasmata also depends on genetic control and varies from one individual to another. In an earlier publication (Müller, 1974), 1.84 was given as chiasma-frequency per bivalent for *Xenopus laevis laevis*. This was based on observations on a single animal, which served to establish the lampbrush karyotype. The higher chiasma-frequency (approximately 2.5), as found in the present study, is certainly more representative. The comparison of *Xenopus* subspecies (L, V and P) hybrids indicates also a modification of the chiasma-frequency by the genetic constitution.

Generally speaking, synapsis and crossing over are indispensable prerequisites for a regular distribution of chromosomes (Darlington, 1937). The observed univalents should thus lead to an irregular distribution of chromosomes during meiosis and to aneuploid gametes. Fischberg, Kobel and Loumont (personal communications) tested the hybrids by backcrossing and observed a very high lethality of the progeny, indicating aneuploidy of the hybrid gametes.

In the present investigation, the number of bivalents is chosen as a measure to express relationships between species, as the number of chiasmata corresponds very well with the number of bivalents found (Table 2). Others, such as Lantz and Callan (1954), registered the number of chiasmata and the number of univalents. The affinity between chromosomes being potentially capable to synapse varies in *Xenopus* hybrid oocytes and depends on the availability of suitable partners. For instance in $2n$ oocytes, in which the two genomes belong to two different species, few chromosomes pair. In $3n$ oocytes (e.g. LGL), in which two genomes derive from one species and the third from another, only bivalents and univalents are formed, in equal numbers. The pairing between chromosomes of different species is superseded by homospecific chromosome pairing. In $6n$ oocytes, possessing four genomes of one species and two genomes of the other, bivalents are formed exclusively. The chromosomes newly synthesized during supplementary reduplication, are isogenetic and the pairing of homologous chromosomes is, in the presence of sister chromosomes, inhibited.

Paired chromosomes lend themselves well to demonstrate the presence of translocations which distinguish the parents. Translocations could then lead to the formation of multivalents. In *Triturus* hybrids (*T. marmoratus* $\times$ *T. cristatus karelinii*) such multivalents are interpreted by Lantz and Callan (1954) as being due to translocations. Likewise, in *Triturus cristatus* subspecies hybrids (Spurway, 1953) multivalents are found in 1% of the number of bivalents. In *Xenopus*, multivalents have not been observed in species hybrids and only rarely in subspecies hybrids (unpublished). Yet, translocations exist (see Jotterand and Fischberg, 1974, for *X. borealis*). Multivalents would probably not be

formed in *Xenopus* species hybrids because of the lack of chiasmata. Translocations, however, could manifest themselves in clearly heterologous bivalents (Fig. 2c).

F₁ hybrids of *Triturus cristatus* subspecies have roughly half the number of chiasmata as the parents (Spurway, 1953). *Xenopus laevis* subspecies hybrids show no such decrease (Table 1). It might well be that *Triturus cristatus* subspecies have nearly reached the species level. Consequently, the *Xenopus laevis* subspecies L, V and P might be more recent evolutionary outcrops.

Hybrids could represent a step of animal speciation. In *Xenopus*, like in many other animals, hybrids occupy a hopeless evolutionary position because of their sterile or aneuploid gametes. In *Xenopus*, species are "good" species and a gene flow across a hybrid bridge seems excluded. A possible way out of this situation is offered by polyploidy. Blair (1972) in *Bufo* and Spurway (1953) in *Triturus* observed 3n or 5n F₂ animals obtained from backcrosses. Both think that polyploidization occurred due to anaphase II anomalies. The observation of 4n oocytes in F₁ and 6n oocytes in triploid backcross hybrids, presented in this paper, suggests, however, a different mechanism for the polyploidization which is in fact the result of a supplementary chromosome reduplication. A similar reduplication is proposed for triploid *Ambystoma* producing hexaploid oocytes (Macgregor and Uzzell, 1964; Cuellar, 1974). The reported spontaneous polyploidization of hybrid cytes (4n spermatocytes from the hinny and the mule have been observed by Chandley et al., 1974) could also have its origin due to a supplementary S-phase preceding meiotic prophase.

If a corresponding duplication on the male side leads to the formation of 2n spermatozoa from 4n spermatocytes, the creation of a new allotetraploid species with disomic inheritance would be possible due to a one step evolutionary mechanism. Bogart and Wassermann (1972) list seven known biparental polyploid species of *Anura*. In *Xenopus* three possibly biparental polyploid species are already known (Tymowska and Fischberg, 1973 and personal communication).

Acknowledgements. Professor Fischberg furthered this investigation by defining its subject and by offering precious advice. Dr. Kobel's stimulating ideas helped to resolve those questions arising from the observed occurrence of polyploid oocytes. Mr. Ken Drury kindly helped with the English. This work has been supported by a grant, No. 3.60.68, from the Fonds national Suisse de la recherche scientifique and the Georges and Antoine Claraz Foundation made the collection of most of the *Xenopus* species possible.

References

- Blackler, A.W., Fischberg, M.: Hybridization of *Xenopus laevis* petersi and *X.l.laevis*. Rev. suisse Zool. **75**, 1023-1032 (1968)
- Blackler, A.W., Fischberg, M., Newth, D.R.: Hybridization of two subspecies of *Xenopus laevis* (Daudin). Rev. suisse Zool. **72**, 841-857 (1965)
- Blackler, A.W., Geckling, C.A.: Transmission of sex cells of one species through the body of a second species in the genus *Xenopus* II. Interspecific matings. Develop. Biol. **27**, 385-394 (1972)
- Blair, W.F.: Evolution in the genus *Bufo*. Austin and London: Univ. of Texas Press 1972
- Blankenhorn, H.J., Heusser, H., Vogel, P.: Drei Phänotypen von Grünfröschen aus dem *Rana esculenta*-Komplex in der Schweiz. Rev. suisse Zool. **78**, 1242-1247 (1971)

- Bogart, J.P., Wasserman, A.O.: Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* **11**, 7-24 (1972)
- Bytynski-Salz, H.: Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Arten der Gattungen *Celerio* und *Pergesa* nach Untersuchungen über die Zytologie und Fertilität ihrer Bastarde. *Biol. Zbl.* **54**, 300-313 (1934)
- Callan, H.G., Lloyd, L.: Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (Laurenti). *Phil. Trans. B* **243**, 135-219 (1960)
- Chandley, A.C., Jones, R.C., Dott, H.M., Allen, W.R., Short, R.V.: Meiosis in interspecific equine hybrids. I. The male mule (*Equus asinus* × *E. caballus*) and hinny (*E. caballus* × *E. asinus*). *Cytogenet. Cell Genet.* **13**, 330-341 (1974)
- Cuellar, O.: On the origin of parthenogenesis in vertebrates: The cytogenetic factors. *Amer. Naturalist* **108**, 625-648 (1974)
- Darlington, C.D.: The biology of crossing-over. *Nature (Lond.)* **140**, 759-761 (1937)
- Delarue, M.: Etude de l'hybridation par la greffe nucléaire et par croisement chez les Bufonides (Amphibiens, Anoures). *Ann. Embr. Morph.* **7**, 425-443 (1974)
- Dumont, J.N.: Oogenesis in *Xenopus laevis*. I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* **136**, 153-179 (1972)
- Elinson, R.P.: Viable amphibian hybrids produced by circumventing a block to cross-fertilization (*Rana clamitans* ♀ × *R. catesbeiana* ♂). *J. exp. Zool.* **192**, 323-330 (1975)
- Fischberg, M., Beatty, R.A.: Heteroploidy in mouse embryos due to crossing of inbred strains. *Evolution (Lancaster, Pa.)* **6**, 316-324 (1952)
- Gallien, Cl. L.: Caractères de la spéciation, hybridation expérimentale et hybridation nucléoplasmique dans le genre *Pleurodeles* (Amphibiens-Urodèles). *Soc. Zool. France* **94**, 293-294 (1969)
- Jotterand, M., Fischberg, M.: A chromosome mutation affecting the number of nucleoli in *Xenopus borealis* Parker. *Experientia (Basel)* **30**, 1003-1005 (1974)
- Kawamura, T., Nishioka, M., Kuramoto, M.: Interspecific hybrids between Japanese and European pond frogs. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol., Hiroshima Univ.* **1**, 277-301 (1972)
- Knoepfler, L.-P.: *Xenopus fraseri* × *Xenopus tropicalis*, hybride naturel d'Amphibiens anoures au Gabon. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **265**, 1391-1393 (1967)
- Kobel, H.R., Du Pasquier, L.: Production of large clones of histocompatible, fully identical clawed toads (*Xenopus*). *Immunogenetics* **2**, 87-91 (1975)
- Lantz, L.A., Callan, H.G.: Phenotypes and spermatogenesis of interspecific hybrids between *Triturus cristatus* and *T. marmoratus*. *J. Genet.* **52**, 165-185 (1954)
- Macgregor, H.C., Uzzell, T.M. Jr.: Gynogenesis in Salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*. *Science* **143**, 1043-1045 (1964)
- Malik, C.P., Grover, I.S.: Cytogenetic studies in *Papaver*. II. Hybrids among species with 7 as the haploid chromosome number. *Caryologia (Firenze)* **26**, 13-25 (1973)
- Müller, W.P.: The lampbrush chromosomes of *Xenopus laevis* (Daudin). *Chromosoma (Berl.)* **47**, 283-296 (1974)
- Parker, H.W.: The taxonomic position and geographical distribution of the genus *Xenopus*. In: Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), IV: 9-12. (P.D. Nieuwkoop and J. Faber, eds.). Amsterdam: North Holland Publ. Comp. 1956
- Riley, R., Law, C.N.: Genetic variation in chromosome pairing. *Advanc. Genet.* **13**, 57-114 (1965)
- Sjödén, J.: Induced asynaptic mutants in *Vicia faba* L. *Hereditas (Lund)* **66**, 215-232 (1970)
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G.: Statistical methods. Ames, Iowa: Iowa State University Press 1967
- Spurway, H.: Genetics of specific and subspecific differences in european newts. *Symp. Soc. exp. Biol.* **7**, 200-237 (1953)
- Twitty, V.C.: Fertility of *Taricha* species-hybrids and viability of their offspring. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **51**, 156-161 (1964)
- Tymowska, J., Fischberg, M.: Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma (Berl.)* **44**, 335-342 (1973)
- Vallée, L.: Recherches sur *Triturus blasii* de l'Isle, hybride naturel de *Triturus cristatus* Laur. × *Triturus marmoratus* Latr. *Mem. Soc. Zool. France* **31**, 1-96 (1959)
- White, M.J.D.: Animal cytology and evolution. London: Cambridge University Press 1973

DISCUSSION

La longueur des chromosomes plumeux de Xenopus laevis est nettement moindre que celle des urodèles (Chromosome I de Xenopus laevis a une longueur moyenne de 122 μ , chromosome I de Triturus cristatus d'environ 900 μ (Callan et Lloyd, 1960)). Cette différence de taille est frappante, comme le montre la Fig. 3, p. 291. Il en ressort que Xenopus ne se prête pas facilement à certaines recherches spécifiques aux chromosomes plumeux. Par contre, il est maintenant possible d'élargir le champ de recherche cytogénétique grâce à la connaissance de ces chromosomes. Une première application est l'analyse des chromosomes des ovocytes d'hybrides de diverses espèces et sous-espèces de Xenopus.

Une carte des chromosomes plumeux de Xenopus laevis a pu être établie, sur laquelle les structures principales qui servent à leur reconnaissance sont indiquées (Fig. 1, p. 289). Il est donc possible d'identifier chaque chromosome, à l'exception des chromosomes XII et XIII dont des différences suffisantes n'ont pu être relevées. L'orientation des chromosomes est arbitraire, puisque les centromères n'ont pu être décelés. La longueur de chaque chromosome varie de préparation en préparation et les tailles des chromosomes voisins chevauchent. Pour cette raison, la longueur, comme seul critère, est insuffisante pour l'identification.

Par contre, d'autres structures ont favorisé cette identification. Les chromosomes plumeux portent souvent des sphères et leur position peut être caractéristique. Sur sept des dix-huit chromosomes, des sphères sont utilisées pour leur reconnaissance. Chez Salamandra salamandra (Mancino et al., 1969), elles servent également de point de repère, mais elles sont sans valeur topographique chez Echinaster (Delobel, 1971). Chez Xenopus laevis, les sphères ont un aspect réfrangible au microscope à contraste de phase et leur diamètre peut mesurer jusqu'à 5μ . Le chromosome XVI porte des sphères vacuolisées caractéristiques qui permettent facilement son identification. Les structures qui se trouvent dessinées en cercle sur le chromosome XVIII sont de petites sphères sous forme de globules noirs de 1 à 2μ de taille. Elles sont attachées à des axes de boucles et non pas à l'axe du chromosome. Deux endroits voisins, au moins, sont impliqués dans leur formation, puisque dans une préparation un double pont entre deux masses de globules a pu être observé.

Les sphères, situées aux endroits correspondants sur les chromosomes homologues, sont normalement identiques. Il y a pourtant quelques exceptions : une sphère plus petite que son homologue, ou bien deux ou plusieurs petites sphères à la place des grandes.

Les boucles sont de taille et de morphologie variables.

C'est surtout par leur arrangement constant le long des axes que les chromosomes peuvent être identifiés. Ce ne sont naturellement que les boucles caractéristiques qui sont repérées, étant donné que la majorité de celles-ci mesurent 10 μ . Longueur et matrice caractérisent les boucles : la longueur totale maximale atteint chez Xenopus 60 μ . Ceci est considérable par rapport à la longueur des chromosomes, dont les plus petits mesurent moins que 60 μ . Parmi les Urodèles, de très grandes boucles sont décrites par Mancino et al. (1969) pour Salamandra salamandra avec 700 μ ou par Callan et Lloyd (1960) pour Triturus cristatus avec 100 μ . La matrice est généralement asymétrique avec, dans le chromomère, l'une des insertions mince et l'autre épaisse. Cette asymétrie est nette sur les grandes boucles de Xenopus laevis. Les petites boucles la laissent parfois deviner, mais la plupart apparaissent uniformes en épaisseur. Une boucle avec une matrice asymétrique typique se situe sur le chromosome I dans le premier tiers et elle est un bon caractère pour l'identification de ce chromosome. Il existe chez Xenopus, à part des boucles normales et des boucles géantes, une troisième catégorie : les boucles granuleuses. Leur matrice est formée de granules noirs d'environ 2 μ et leur taille dépasse celle des boucles normales; ces boucles se trouvent sur les chromosomes III et VI.

Les chromosomes plumeux, structures longues et délicates, subissent pendant leur préparation des forces mécaniques. Une élongation possible jusqu'à 130% sans cassure, due à leur élasticité, est rapportée par Callan et Lloyd (1960). En cas de rupture, le chromosome lâche au milieu d'un chromomère. Cela cause la formation d'un double pont, puisque les axes des deux boucles relient les deux bouts de l'axe du chromosome. Certains endroits sont prédisposés pour la formation de doubles ponts (Lacroix, 1968; Barsacci et al., 1970) et peuvent ainsi aider dans l'identification des chromosomes. Parmi les doubles ponts spontanés chez Xenopus, le chromosome III les montre fréquemment dans la région terminale des grandes boucles. Ceci n'a pas grand importance pour l'identification de ce chromosome car il est déjà facile à reconnaître grâce à d'autres caractères.

Une analyse des chiasmata a été effectuée sur les dix préparations ayant servi à établir le caryotype. Leur nombre moyen par bivalent est de 1.86. Ce chiffre est bas, et une analyse plus poussée de sous-espèces de Xenopus laevis révèlent une moyenne d'environ 2.5 chiasmata par bivalent. Cette estimation est certainement plus juste. La différence trouvée montre néanmoins la variabilité qui existe entre les individus. Comme les animaux tenus en laboratoire sont souvent des descendants d'incestes, leur patrimoine génétique individuel peut fortement différer du patrimoine génétique d'une population.

La fréquence des chiasmata étant soumise au contrôle génétique, une telle différence entre individus semble tout à fait plausible.

Un test statistique n'a pas démontré de relation entre des longueurs des chromosomes et le nombre des chiasmata chez Xenopus ainsi que chez Triturus helveticus helveticus, Triturus italicus et Triturus marmoratus. Cependant, le même test révèle une corrélation directe chez Salamandra salamandra, Triturus alpestris alpestris, Triturus vulgaris meridionalis et Rana esculenta. Pour toutes les espèces précitées, Xenopus mis à part, les dates des publications originales ont été utilisées (voir références dans le chapitre précédent). Une analyse de la localisation des chiasmata montre, d'une part une distribution terminale et, d'autre part, une relation entre la situation des chiasmata et la longueur du chromosome: plus les chromosomes sont courts, plus les chiasmata sont distribués distalement. Cette localisation pourrait être attribuée à une rigidité mécanique: les chiasmata se sont déplacés depuis leur formation (terminalisation). Une autre possibilité serait d'approuver les résultats et interprétations de Henderson (1963) chez Schistocerca gregaria: d'un endroit fixe d'un premier chiasma, grâce à une interférence, un deuxième chiasma pourrait se former, mais à une certaine distance seulement. Si cet endroit fixe se trouve dans les parties distales du chromosome, la distribution des chiasmata serait celle que l'on trouve.

Un ovocyte hybride renferme des univalents et des bivalents. Leur nombre peut varier et se trouve, chez Xenopus, entre 0 et 16 bivalents. Ce nombre donne une indication de la position

relative de deux espèces parentales. Plus deux espèces sont génétiquement semblables, plus le nombre de bivalents est élevé. Les relations entre X.borealis (B), X.clivii (C), X.fraseri (F), X.gilli (G), X.laevis laevis (L), X.mülleri (M), X.l.petersi (P) et X.l.victorianus (V) ont ainsi été analysées (tableau 2, p.25). Le nombre moyen de bivalents trouvés permet de dresser un schéma (Fig. 3, p.31), représentant la position systématique tentative de ces espèces du genre Xenopus. D'après ces résultats, toutes les espèces analysées sont des espèces définies à l'exception de L, V et P qui sont des sous-espèces de X.laevis. G se trouve près de X.laevis, B et M sont relativement liées et les autres espèces n'ont pas d'affinité particulière les unes avec les autres. Selon Parker (1956), "X.l.borealis" est affilié comme sous-espèce au X.laevis Rassenkreis. Tymowska et Fischberg (1973), se basant sur l'analyse de caryotypes mitotiques et la stérilité des mâles hybrides (Fischberg, communication personnelle) séparent cependant X.borealis pour la considérer comme une espèce définie. Les résultats présentés ici sont parfaitement en accord avec cette modification systématique, vu le petit nombre de bivalents formés dans les hybrides LB et VB.

Les chromosomes diplotènes chez les organismes hybrides apparaissent sous forme d'univalents ou de bivalents. Le contrôle génétique qui assume la présence de bivalents agit à deux niveaux: le premier dirige l'appariement des chromosomes ("homologues") et le second la formation des chiasmata. Les chromosomes se présentent comme univalents si l'un ou l'autre de ces contrôles fait défaut.

La division méiotique, qui se déroule à partir d'univalents, ne distribuera pas les chromosomes d'une façon ordonnée dans les gamètes. Ces gamètes seront donc aneuploïdes, ce qui explique la stérilité des individus hybrides. Une évidence indirecte de cette aneuploïdie nous provient de croisements de retour, dont la descendance est peu viable et dont les embryons, par suite de graves malformations (Fischberg, Kobel. Loumont, communication personnelle; Müller, non publié), meurent tôt.

C'est l'appariement et la présence d'un ou plusieurs chiasmata, et non le nombre de ces derniers qui est important pour la distribution régulière des chromosomes au cours de la méiose. Pour cette raison, non pas le nombre de chiasmata mais le nombre de bivalents a été choisi comme critère (Lantz et Callan, 1954). Le nombre de bivalents et le nombre de chiasmata sont cependant proportionnels chez les hybrides du genre Xenopus mais il a été impossible de prévoir un parallélisme entre les deux critères. Mather et Lamm (1935) distinguent trois types de réactions chez des animaux hybrides concernant le nombre de chiasmata formés par bivalent. Le premier montre une augmentation et le nombre total des chiasmata est celui des cytes ne formant que des bivalents. Dans le deuxième, le nombre de chiasmata par bivalent reste stable (le nombre total diminué) et, dans le troisième, il se forme moins de chiasmata par bivalent. Les hybrides de Xenopus appartiennent donc à ce troisième type ayant environ $2.5 \times$ par bivalent chez les espèces pures et 1 ou rarement $2 \times$ par bivalent chez les hybrides (tableau 2).

Des translocations qui distinguent les animaux parents se manifestent dans l'appariement des chromosomes chez l'hybride où des polyvalents peuvent être formés. Chez des hybrides d'espèces de Iriturus, des polyvalents ont été interprétés par Lantz et Callan (1954) comme étant causés par des translocations. Spurway (1953) interprète de la même façon le 1% de polyvalents trouvés dans des hybrides de sous-espèces de Iriturus cristatus. Chez le *Xenope*, des polyvalents n'ont pas été observés, ni chez les hybrides d'espèces ni chez ceux de sous-espèces. Des translocations existent pourtant, au moins chez X.borealis (Jotterand et Fischberg, 1973). D'une part, elles pourraient ne pas être mises à jour parce que les deux chromosomes homologues ne sont que rarement appariés. D'autre part, certains bivalents observés sont sans doute hétérologues; cette différence de longueur pourrait manifester une translocation, ou éventuellement une autre modification chromosomique.

Au cours de ces recherches, des ovocytes triploïdes ou tétraploïdes ont été trouvés. Les ovocytes triploïdes existent chez quelques animaux (probablement triploïdes) dont les ovaires contiennent exclusivement des ovocytes triploïdes. Les chromosomes forment des bivalents et des univalents en nombre égal, 18 de chaque. Des trivalents n'ont pas pu être observés. Les combinaisons d'hybrides où des animaux à ovocytes triploïdes ont été décelés, sont marqués par * dans le tableau 2, p.25. Les ovocytes tétraploïdes, par contre, ont été trouvés chez des hybrides diploïdes, et font partie d'un ovaire composé d'ovocytes diploïdes et tétraploïdes dans des proportions variables. Ces combinaisons d'hybrides

sont marquées par ** dans le tableau 2, p.25. Le nombre de bivalents dans les ovocytes diploïdes est restreint et dépend de la combinaison hybride. Les ovocytes tétraploïdes par contre contiennent toujours 36 bivalents. Ces génomes accessoires ont leur origine dans une duplication supplémentaire. L'appariement est restreint aux chromosomes identiques (chromosomes frères) et la ségrégation méiotique engendre des oeufs diploïdes avec un génome complet de chaque espèce parentale. Pour ces raisons, le génotype de ces oeufs diploïdes est identique à celui de leur mère (Kobel et Dupasquier, 1975).

Il est possible, par déduction, d'approcher le moment de cette duplication supplémentaire. Elle a dû avoir lieu avant le zygotène car autrement des polyvalents résulteraient de ces quelques bivalents constitués avant la reduplication. Dans les ovocytes diploïdes de LG, p. ex., le nombre de ces bivalents peut être considérable. Des polyvalents n'ont cependant jamais été observés dans des ovocytes tétraploïdes.

Cuellar (1974) n'exclut pas une reduplication comme événement gonial, c'est-à-dire mitotique. A un certain moment, les ovogonies se fixent dans l'ovaire et chacune donne naissance à un clone de cellules identiques. Une distribution de clone d'ovocytes tétraploïdes à la façon d'une mosaïque pourrait donc être trouvée dans un ovaire, si la duplication était un événement ovogonial, même peu précoce. Une telle distribution de clones en mosaïque n'est cependant pas observée et il faut en conclure que le moment de la duplication supplémentaire doit avoir lieu après

la multiplication ovogoniale au passage différentiel, quand l'ovogonie devient ovocyte.

L'apparition de gamètes ayant le même nombre de chromosomes que le parent pourrait être un phénomène général dans des individus hybrides (Cuellar, 1974). Différents mécanismes de restitution du nombre des chromosomes dans la lignée germinale peuvent produire de tels gamètes. Les résultats présentés montrent une duplication supplémentaire préméiotique pour les hybrides de Xenopus. Dans des hybrides de Bufo, Blair (1972) attribue la restitution à une défaillance anaphasique; le deuxième globule polaire participerait alors au patrimoine chromosomique de l'oeuf.

Une réduplication peut avoir des conséquences évolutives. Il existe des biotypes triploïdes qui produisent des ovocytes hexaploïdes et qui engendrent une progéniture par parthénogenèse (Cnemidphorus; Maslin, 1971) ou par gynogenèse (Ambystoma; Macgregor and Uzzell, 1964 et Poecilipsis; Cimino, 1972). Chez les batraciens, la polyploïdie, connue dans quatre familles, a dû jouer un rôle important dans l'évolution (Batistic et al., 1975). En particulier chez Xenopus, trois espèces polyploïdes sont connues: X. vestitus (4n) (Tymowska, Fischberg et Tinsley, sous presse), X. ruwenzoriensis (6n) (Tymowska et Fischberg, 1973) et X. sp.n. (4n) (Tymowska et Fischberg, communication personnelle).

Il est maintenant possible d'établir des hypothèses tentant à expliquer comment des espèces polyploïdes bisexuées ont pu être créées à l'aide d'oeufs diploïdes ou polyploïdes.

Première hypothèse : Il suffirait pour cela d'admettre qu'un mécanisme de reduplication ait lieu dans la lignée germinale des hybrides mâles. Une descendance tétraploïde serait ainsi obtenue par fécondation de deux gamètes diploïdes.

Néanmoins, chez Xenopus, ces descendants sont des femelles exclusivement. Le sexe est chez Xenopus déterminé par des chromosomes W et Z, les femelles étant le sexe hétéro-gamétique (Gallien, 1956; Chang et Witschi, 1956). Tout oeuf diploïde contient, comme la femelle, les chromosomes W et Z tandis que les spermatozoïdes diploïdes apportent deux chromosomes Z. Les animaux résultant des fusions de ces deux gamètes sont porteurs de WZZZ. Ces hybrides sont des femelles fonctionnelles et elles produisent deux classes de gamètes : WZ et ZZ. Un croisement de retour, avec un mâle, producteur de spermatozoïdes diploïdes (ZZ) mène à deux classes d'animaux dans la progéniture, notamment WZZZ (femelles) et ZZZZ (mâles). Ces deux dernières représenteraient un nouveau biotype tétraploïde et bisexué.

Deuxième hypothèse : Des oeufs diploïdes (WZ), fécondés par des spermatozoïdes (Z) d'un mâle provenant d'une des espèces parentales, forment des femelles fonctionnelles triploïdes (WZZ). Des duplications chromosomiques dans la lignée germinale de ces femelles fournissent des ovocytes hexaploïdes qui deviennent des oeufs triploïdes (WZZ). En effet, des ovocytes hexaploïdes ont été observés dans des femelles LGL, issues de croisements de retour. Ces oeufs triploïdes peuvent à nouveau être fécondés par des spermatozoïdes (Z) d'un mâle appartenant encore une fois à une espèce parentale de l'hybride en question. Les organismes tétra-

ploïdes engendrés sont des femelles fonctionnelles (WZZZ) qui produisent deux classes d'oeufs: WZ et ZZ. Les oeufs WZ, fécondés par des spermatozoïdes (Z) donnent naissance à des femelles triploïdes WZZ et les oeufs ZZ à des mâles triploïdes ZZZ. Le nombre de chromosomes dans les spermatozoïdes de ces mâles triploïdes varie entre n et $2n$, variation due à une distribution accidentelle lors de la méïose (Fischberg, communication pers.). Il est donc possible d'obtenir des spermatozoïdes diploïdes. Ces derniers peuvent féconder des oeufs soit WZ, soit ZZ provenant de femelles tétraploïdes, et créer ainsi des femelles (WZZZ) ou des mâles (ZZZZ).

La première hypothèse peut paraître plus simple mais la duplication chromosomique chez les mâles hybrides diploïdes n'a pas été constatée. En effet, des croisements de retour montrent une stérilité mâle (Fischberg, Loumont, communication personnelle). La deuxième hypothèse est probablement plus juste, malgré sa complexité apparente. Des suppositions cruciales de la deuxième hypothèse se fondent sur des faits réels: les femelles triploïdes contiennent des ovocytes hexaploïdes, et les mâles triploïdes peuvent fournir des spermatozoïdes diploïdes.

Il est évidemment possible d'envisager la production d'oeufs tétraploïdes par des femelles tétraploïdes. Ces oeufs se développeraient par gynogénèse ou par parthénogénèse comme cela a été observé chez Ambystoma (Macgregor et Uzzell, 1964), Poeciliopsis (Cimino, 1972) et Cnemidophorus (Maslin, 1971) ou encore chez les "faux hybrides" diploïdes de X. mülleri x X. laevis. Ces derniers se développaient spontanément après fécondation naturelle ou artificielle au laboratoire (Loumont, communication personnelle). Parthénogénèse et gynogénèse pourraient être des

étapes passagères de l'évolution qui conduirait à des espèces tétraploïdes comprenant des ♂♂ et des ♀♀ fonctionnels.

Les ovocytes hybrides polyploïdes pourront servir et servent déjà à différentes recherches. Kobel et Du Pasquier (1975) ont utilisé les oeufs issus d'ovocytes polyploïdes pour créer des grenouilles par gynogenèse, déclenchée par des spermatozoïdes irradiés. Tous les animaux produits par la même femelle hybride sont des femelles isogénétiques et identiques à leur mère. Des transplantations de peau et des réactions spécifiques aux lymphocytes mélangés provenant de différents individus ont prouvé l'isogénéité. Il est donc possible de produire en grande quantité et probablement pendant un temps illimité des clones d'animaux isogénétiques. Comme chaque génération gynogénétique est identique à sa mère, toutes les générations suivantes devraient l'être également.

Seulement à condition que la méiose sépare des chromosomes identiques, ces clones ainsi produits seront isogénétiques. Les chromosomes, une fois reproduits par la duplication supplémentaire, pourraient éventuellement s'apparier avec un autre chromosome homologue. Les oeufs, la méiose accomplie, auraient des contenus génétiques différents. L'observation de l'isogénéité des clones prouve ainsi l'isogénéité des chromosomes frères qui forment un bivalent dans un ovocyte polyploïde.

RESUME

Première partie:

1. Un milieu permettant la préparation des chromosomes d'ovocytes a été élaboré pour Xenopus laevis. Le suc nucléaire, plus consistant que celui des Urodèles se laisse moins facilement liquéfier. L'addition directe de formol dans le milieu contribue à la dissolution de ce suc.
2. Les chromosomes plumeux de Xenopus laevis ont les mêmes structures fondamentales que les chromosomes plumeux typiques: boucles, chromomères, sphères, télomères, granules axiales et structures terminales.
3. Les chromosomes plumeux de Xenopus laevis sont à peu près huit fois plus courts que ceux de Triturus cristatus.
4. Une carte des chromosomes plumeux de Xenopus laevis a été dressée. Elle permet l'identification des chromosomes (à l'exception des chromosomes XII et XIII qui demeurent malaisés à différencier).
5. Les caractères principaux des chromosomes plumeux et leur variabilité ont été décrits.
6. Aucune corrélation entre les longueurs des chromosomes plumeux et le nombre de chiasmata par bivalent n'a été trouvée.
7. Les chiasmata montrent une distribution distale au stade observé.
8. Plus les chromosomes sont courts, plus la localisation des chiasmata est terminale.

Deuxième partie:

9. Les chromosomes provenant d'ovocytes de femelles hybrides

ont été analysés.

10. Les hybrides des sous-espèces de X. laevis ne possèdent que des bivalents. Le nombre de chiasmata est néanmoins différent dans certaines combinaisons hybrides.
11. Les hybrides des espèces possèdent des univalents et des bivalents. La plupart des bivalents sont formés par des chromosomes semblables, mais quelques bivalents hétérologues sont reconnus.
12. Les nombres de bivalents et de chiasmata sont rapportés. Le nombre de bivalents varie entre 0 et 2 pour la plupart des combinaisons hybrides. LG, VG et PG comptent davantage (entre 4 et 18); BM et MB en ont respectivement 3 et 5.
13. Le petit nombre de chiasmata par bivalent formé laisse supposer une hétérogénéité partielle des partenaires d'un bivalent.
14. Etant donné que le nombre de bivalents dans un ovocyte hybride révèle la relation de parenté des deux espèces concernées, les résultats présentés contribuent à éclaircir les relations systématiques restées vagues jusqu'à présent au sein du genre Xenopus.
15. Il en résulte que "X.l.borealis" est séparé du X. laevis *Rassenkreis*, séparation qui rejoint la conclusion de Tymowska et Fischberg (1973). Toutes les espèces analysées sont des espèces bien définies, à l'exception des sous-espèces de X. laevis (laevis, petersi, victorianus).
16. Une approche des relations systématiques des espèces analysées de Xenopus est représentée d'une façon schématique.
17. Des ovocytes polyploïdes ont été trouvés chez quelques

hybrides diploïdes. Cette polyploïdisation est due à une réduplication entière de tous les chromosomes et la duplication supplémentaire se situe vraisemblablement pendant l'ovogenèse, au moment où les ovogonies deviennent ovocytes.

18. La potentialité évolutive de ces ovocytes pourrait mener à la création d'espèces polyploïdes nouvelles; à ce sujet, deux hypothèses sont émises. Il s'agirait d'espèces allopolyploïdes, puisque leur origine débute avec une hybridation.
19. Les oeufs, issus d'ovocytes polyploïdes, sont à la base de nouvelles recherches diversifiées. Kobel et Du Pasquier (1975) créent des clones isogénétiques en stimulant ces oeufs, par des spermatozoïdes irradiés, et provoquent ainsi un développement par gynogenèse.
20. L'isogénéité des clones prouve l'isogénéité des chromosomes (frères) formant un bivalent dans un ovocyte hybride polyploïde.

REFERENCES concernant l'introduction et la discussion

- Ahmad, M.S.: Development, structure and composition of lampbrush chromosomes in domestic fowl. *Canad. J. Genet. Cytol.* 12, 728-737 (1970)
- Baker, T.G., Franchi, L.L.: The structure of the chromosomes in human primordial oocytes. *Chromosoma (Berl.)* 22, 358-377 (1967)
- Barsacchi, G., Bussotti, L., Mancino, G.: The maps of the lampbrush chromosomes of *Triturus* (Amphibia Urodela). IV. *Triturus vulgaris meridionalis*. *Chromosoma (Berl.)* 31, 255-279 (1970)
- Batistic, R.F., Soma, M., Beçak, M.L., Beçak, W.: Further Studies on Polyploid Amphibians: A diploid population of *Phyllomedusa burmeisteri*. *Heredity* 66, 160-162 (1975)
- Blair, W.F.: Evolution in the genus *Bufo*. Austin and London: Univ. of Texas Press 1972
- Callan, H.G.: The lampbrush chromosomes of *Sepia officinalis* L., *Anilocra physodes* L. and *Scyllium catulus* Cuv. and their structural relationship to the lampbrush chromosomes of Amphibia. *Pubbl. Staz. Napoli* 29, 329-346 (1957)
- Callan, H.G., Lloyd, L.: Lampbrush chromosomes of crested newts *Triturus cristatus* (Laurenti). *Phil. Trans. B* 243, 135-219 (1960)
- Chang, C.Y., Witschi, E.: Genetic control and hormonal reversal of sex differentiation in *Xenopus*. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 93, 140-144 (1956)
- Cimino, M.C.: Egg-Production, Polyploidization and Evolution in a diploid all-female Fish of the genus *Poeciliopsis*. *Evolution* 26, 294-306 (1972)
- Cuellar, O.: On the origin of parthenogenesis in vertebrates: The cytogenetic factors. *Amer. Natur.* 108, 625-648 (1974)
- Delobel, N.: Etude descriptive des chromosomes en écouvillon chez *Echinaster sepositus* (Echinoderme, Astéride). *Ann. Embr. Morph.* 4, 383-396 (1971)
- Fischberg, M.: personal communication

- Flemming, W.: Zellsubstanz, Kern, und Zelltheilung. Leipzig: F.C.W. Vogel 1882
- Gallien, L.: Inversion expérimentale du sexe chez un Anoure inférieur *Xenopus laevis* Daudin. Analyse des conséquences génétiques. Bull. biol. France et Belgique 90, 164-183 (1956)
- Giorgi, F., Galleni, L.: The lampbrush chromosomes of *Rana esculenta* L. (Amphibia-Anura). Caryologia (Firenze) 25, 107-123 (1972)
- Grun, P.: Plant lampbrush chromosomes. Exp. Cell Res. 14, 619-621 (1958)
- Henderson, S.A.: Chiasma distribution at diplotene in a locust. Heredity 18, 173-190 (1963)
- Hess, O.: Veränderungen der Chromosomenstruktur und ihre Beziehungen zur genetischen Funktion. Rev. suisse Zool. 76, 603-641 (1969)
- Jotterand, M., Fischberg, M.: A Chromosome Mutation affecting the number of Nucleoli in *Xenopus borealis* Parker. Experientia 30, 1003-1005 (1974)
- Koecke, H.U., Müller, M.: Formwechsel und Anzahl der Chromosomen bei Huhn und Ente. Naturwissenschaften 52, 483 (1965)
- Kobel, H.R.: personal communication
- Kobel, H.R., Du Pasquier, L.: Production of large clones of histocompatible, fully identical clawed toads (*Xenopus*). Immunogenetics 2, 87-91 (1975)
- Kunz, W.: Lampenbürstenchromosomen und multiple Nukleolen bei Orthopteren. Chromosoma (Berl.) 21, 446-462 (1967)
- Lacroix, J.C.: Etude descriptive des chromosomes en écouvillon dans le genre *Pleurodeles* (Amphibien, Urodèle). Ann. Embr. Morph. 1, 179-202 (1968)
- Lantz, L.A., Callan, H.G.: Phenotypes and spermatogenesis of interspecific hybrids between *Triturus cristatus* and *T. marmoratus*. J. Genetics 52, 165-185 (1954)

Loumont, C.: personal communication

Lu, B.C., Raju, N.D.: Meiosis in *Coprinus* II. Chromosome pairing and the lampbrush diplotene stage of meiotic prophase. *Chromosoma (Berl.)* 29, 305-316 (1970)

Macgregor, H.C., Kezer, J.: Gene amplification in oocytes with 8 germinal vesicles from the tailed frog *Ascaphus truei* Stejneger. *Chromosoma (Berl.)* 29, 189-206 (1970)

Macgregor, H.C., Uzzell, T.M. Jr.: Gynogenesis in Salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*. *Science* 143, 1043-1045 (1964)

Mancino, G., Barsacchi, G., Nardi, I.: The lampbrush chromosomes of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia Urodela). *Chromosoma (Berl.)* 26, 365-387 (1969)

Maslin, T.P.: Conclusive evidence of parthenogenesis in three species of *Cnemidophorus* (Teiidae). *Copeia* 1971, 156-158 (1971)

Mather, K., Lamm, R.: The negative correlation of chiasma frequencies. *Hereditas* 20, 65-70 (1935)

Parker, H.W.: The taxonomic position and geographical distribution of the genus *Xenopus*. In *Normal table of Xenopus laevis* (Daudin), IV: 9-12. Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (Eds.). Amsterdam: North Holland Publ. Co. 1956

Ribbert, D., Kunz, W.: Lampenbürstenchromosomen in den Oocytenkernen von *Sepia officinalis*. *Chromosoma (Berl.)* 28, 93-106 (1969)

Spurway, H.: Genetics of specific and subspecific differences in european newts. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7, 200-237 (1953)

Srivastava, M.D.L., Bhatnagar, A.N.: Lampbrush chromosomes of *Rana cyanophlyctis*. *Cytologia (Tokyo)* 27, 60-71 (1962)

Ullerich, F.-H.: DNS-Gehalt und Chromosomenstruktur bei Amphibien. *Chromosoma (Berl.)* 30, 1-37 (1970)

Tymowska, J. : personal communication

Tymowska, J., Fischberg, M.: Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma (Berl.)* 44, 335-342 (1973)

Tymowska, J., Fischberg, M., Tinsley, R.C.: sous presse

